

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POST GRADO**



***Caracterización farmacológica y funcional de  
la subunidad  $\alpha 9\alpha 10$  del receptor nicotínico de  
la célula cromafín de la médula de la rata***

**TESIS  
para optar al Grado Académico de Magíster en  
Farmacología con Mención en Farmacología  
Experimental**

**AUTOR  
Luis Alcides Olivós Oré**

**Lima – Perú**

**2007**

## **Dedicatoria**

---

**A mis padres, Ava y Juan,  
por su cariño y dedicación absoluta a sus hijos**

**A mis hermanos, Eveling y Juanito, por su cariño de siempre**

**A mis abuelos, María, María Jesús, Luis y Silvano  
por enseñarme a tener sueños y cumplirlos**

## **Agradecimientos**

---

A los Doctores  
José Juárez Eyzaguirre, M<sup>a</sup> Victoria Barahona y Antonio R. Artalejo,  
mis Directores de Tesis,  
por su invalorable apoyo y  
permanente asesoría durante el desarrollo de este trabajo

A mis amigos de la Cátedra de Farmacología, Terapéutica y Farmacia de la  
Facultad de Veterinaria (UCM), España:  
Mariló, Casilda, Manolo, Chema, Mariano, Julio, Teresa, Mara, Fernando, Juan Antonio,  
Gema y Diego

A Karina, Glenda, Elva, Maricela y July  
por vuestra amistad, cariño, compañía y sonrisas de siempre

---

A los Miembros del Jurado Informante y Examinador

**PRESIDENTE:**

Dr. Fernando Quevedo Ganoza

**MIEMBROS:**

Dr. Jorge Arroyo Acevedo

Dra. Arilmí Gorriti Gutiérrez

Dr. Víctor Izaguirre Pasquel

Dr. José Juárez Eyzaguirre

# Índice

## Índice

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
<b>Objetivos</b>	<b>12</b>
<b>2. Generalidades</b>	<b>14</b>
<b>2.1. La glándula adrenal</b>	<b>15</b>
<i>2.1.1. La corteza adrenal</i>	<b>15</b>
<i>2.1.2. La médula adrenal</i>	<b>18</b>
<b>2.2. La exocitosis de catecolaminas en las células cromafines de la médula adrenal</b>	<b>21</b>
<i>2.2.1. Las proteínas del complejo de fusión</i>	<b>23</b>
<b>2.3. Estructura y función de los receptores nicotínicos</b>	<b>26</b>
<i>2.3.1. Los receptores nicotínicos neuronales</i>	<b>29</b>
<i>2.3.2. Los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal</i>	<b>31</b>
<i>2.3.3. Los receptores nicotínicos <math>\alpha_9\alpha_{10}</math></i>	<b>31</b>
<i>2.3.4. Papel del receptor <math>\alpha_9\alpha_{10}</math> en las células ciliadas de la cóclea</i>	<b>33</b>
<b>2.4. La técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (“patch-clamp”)</b>	<b>34</b>
<b>2.5. Motivación del estudio realizado</b>	<b>38</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Materiales y equipos</b>	<b>40</b>
<i>3.1.1. Reactivos y productos químicos</i>	<b>40</b>
<i>3.1.2. Material biológico</i>	<b>42</b>

---



3.1.3. Material fungible	42
3.1.4. Equipos	42
3.1.5. Programas informáticos	42
<b>3.2. Métodos</b>	<b>43</b>
3.2.1. Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de la rata	43
3.2.2. Registro de corrientes iónicas y de la capacitancia de la membrana con la técnica de “patch-clamp”: Análisis farmacológico de las respuestas	44
3.2.3. Estudio de la selectividad iónica de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la rata	47
3.2.4. Estudio de la modulación por $\text{Ca}^{2+}$ extracelular de los receptores nicotínicos de las células cromafines de rata.	51
3.2.5. Análisis de ARNm de células cromafines de rata mediante RT-PCR	52
3.2.6. Análisis estadístico	54
<b>4. Resultados</b>	<b>55</b>
4.1. Reproducibilidad de las corrientes inducidas por ACh en las células cromafines de la rata	56
4.2. Caracterización farmacológica de los receptores nicotínicos de la célula cromafín de la rata	57
4.3. Caracterización farmacológica del receptor nicotínico $\alpha_9\alpha_{10}$ de la célula cromafín de la rata	60
4.4. Identificación de los receptores $\alpha_9\alpha_{10}$ mediante RT-PCR de las subunidades $\alpha_9\alpha_{10}$ en las células cromafines de la rata	63
4.5. Estudio de la selectividad iónica de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la rata	65
4.6. Modulación de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la rata por $\text{Ca}^{2+}$ extracelular	72
4.7. Acoplamiento de la corriente nicotínica con la respuesta secretora de las células cromafines de la rata	75

<b>5. Discusión</b>	<b>80</b>
<b>5.1. Caracterización farmacológica e identificación molecular del receptor         nicotínico <math>\alpha_9\alpha_{10}</math> de las células cromafines de la rata</b>	<b>82</b>
<b>5.2. Selectividad iónica de los nAChRs de las células cromafines de la rata</b>	<b>86</b>
<b>5.3. Modulación de los nAChRs de las células cromafines de la rata por         <math>\text{Ca}^{2+}</math> extracelular</b>	<b>88</b>
<b>5.4. Importancia fisiológica del receptor <math>\alpha_9\alpha_{10}</math> en la exocitosis de las células         cromafines de la rata</b>	<b>90</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>93</b>
<b>7. Referencias bibliográficas</b>	<b>95</b>

---

## **Abreviaturas**

A	Adrenalina
a	Actividad Iónica
ACTH	Hormona corticotrópica (corticotropina)
ACTRH	Hormona liberadora de corticotropina
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP.Na <sub>2</sub>	Sal sódica de Adenosín trifosfato
Atr	Atropina
AVP	Arginina vasopresina
Bic	Bicuculina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
Cit	Citosina
Cs <sup>+</sup>	Cesio
Cs <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de cesio
CsCl	Cloruro de cesio
CsGlu	Glutamato de cesio
CsOH	Hidróxido de cesio
CYP11A1	20,22 desmolasa
Cho	Colina
ΔC	Diferencia de capacitancia
DBH	Dopamina beta hidroxilasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMPP	Dimetilfenilpiperazino
d-Tub	d-tubocurarina
DTT	Dithiothreitol
ESM	Error estándar de la media
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
EP	Potencial de la solución de la pipeta
E <sub>rev</sub>	Potencial de reversión
E <sup>S</sup>	Potencial de la solución externa
Est	Estricnina
F	Constante de Faraday
fF	Femtofaradios
FNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa
g	Gramos
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GHK	Goldmann Hodking y Katz (Ecuación)
GTP	Guanosín trifosfato
GTP.Li <sub>2</sub>	Sal de litio del guanosín trifosfato
GTS-21	3-(2,4-dimethoxybenzylideno) anabaseína
GΩ	Gigaohmios
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	N-hidroxietilpiperazina-N-etanosulfonato

5-HT	5 hidroxitriptamina
I	Intensidad / Fuerza Iónica
I <sub>x</sub>	Corriente inducida por el agonista X
I/V	Intensidad/Voltaje
IHC	Célula ciliada interna (“Inner Hair Cell”)
K <sup>+</sup>	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodalton
KGlu	Glutamato de potasio
KHz	Kilohertz
LAAD	L-aminoácido aromático descarboxilasa
L-DOPA	Levo dihidroxifenilalanina
Li <sup>+</sup>	Litio
LiCl	Cloruro de litio
ln	Logaritmo neperiano
M	Molaridad
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MLA	Metililcaconitina (metilcaconitina)
MLV-RT	Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mOsm	Miliosmol
ms	Milisegundos
mV	Milivoltios
MΩ	Megaohmios
n	Número de experimentos
NA	Noradrenalina
Na <sup>+</sup>	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NaOH	Hidróxido de sodio
Nic	Nicotina
OHC	Célula ciliada externa (“Outer Hair Cell”)
Oxo-M	Oxotremorina-M
P	Probabilidad
pA	Picoamperio
pb	Pares de bases
pC	Picocoulombios
P <sub>X</sub> /P <sub>Na</sub>	Permeabilidad de X respecto al sodio
pF	Picofaradios
pf	Corriente fraccional
pS	Picosiemmens
Q	Carga de corriente
R	Constante molar de los gases
RT-PCR	<i>Retro Transcriptasa - Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>
s	Segundos
SNARE	(“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor”)
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Sustancia P

StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis
T	Temperatura absoluta
<i>t</i>	t de Student
TH	Tirosina Hidroxilasa
TrisHCl/TrisCl	Clorhidrato de Tris[hidroximetil]aminometano
u	Unidades
<i>u</i>	Movilidad iónica
VIP	<i>Péptido Intestinal Vasoactivo</i>
V <sub>M</sub>	Potencial de membrana
V <sub>PD</sub>	Potencial de difusión
z	Valencia
α-BgTx	α-bungarotoxina
γ	Coefficiente de actividad iónica
Λ <sup>0</sup>	Conductancia límite equivalente
[X]	Concentración molar de X

## Resumen

La reciente identificación de las subunidades nicotínicas  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  en células sensoriales del aparato auditivo y en neuronas de los ganglios raquídeos, motivaron a investigar la posible expresión de estas subunidades en el parénquima adrenomedular. Mediante la técnica electrofisiológica de “patch-clamp”, se ha medido las corrientes mediadas por los receptores nicotínicos de la acetilcolina en células cromafines de rata (nAChRs). Dos agonistas nicotínicos, la acetilcolina (ACh) y nicotina (Nic) activaron corrientes con una concentración eficaz 50 ( $CE_{50}$ ) de 63 y 24  $\mu$ M, respectivamente. La colina, agonista selectivo de receptores nicotínicos  $\alpha_7$  y  $\alpha_9\alpha_{10}$ , y la oxotremorina-M, agonista del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$ , indujeron respuestas con eficacias del 13% y 27%, respectivamente, con respecto a la obtenida con ACh (100  $\mu$ M). La  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgTx) bloqueó parcial y reversiblemente ( $CI_{50}$  de 3,13 nM) las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M), sugiriendo la presencia de un nAChR formado por subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  en esta preparación. Los efectos bloqueantes de d-tubocurarina, estricnina, atropina y Nic sobre corrientes inducidas por Oxo-M confirmaron esta interpretación. El estudio de la selectividad iónica de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ , determinó la siguiente secuencia de permeabilidades:  $Ca^{2+} \gg Cs^+ > Na^+ \geq Li^+ \gg Tris^+$ . Los resultados indican que los  $\alpha_9\alpha_{10}$  son altamente permeables al  $Ca^{2+}$  y que este catión modula la corriente a través de dicho receptor. Finalmente, cabe señalar que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$  fue capaz de inducir la respuesta secretora en células cromafines de rata.

**Palabras claves:** Canal iónico activado por ligando, receptor nicotínico, célula cromafín, oxotremorina-M, permeabilidad al  $Ca^{2+}$ , respuesta secretora, rata.



## Summary

The recent identification of  $\alpha_9$  nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits and of its interacting partner  $\alpha_{10}$  in sensory cells of the auditory apparatus and dorsal root ganglia neurones, prompted us to investigate whether they could also participate in the efferent synaptic signalling at the adrenal medulla level. We have measured nAChR-mediated currents in rat chromaffin cells by using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Acetylcholine (ACh) and nicotine (Nic) activated inward currents in chromaffin cells with  $EC_{50}$  of 63 and 24  $\mu$ M, respectively. Choline, a selective agonist  $\alpha_7$  and  $\alpha_9\alpha_{10}$  nAChRs, and oxotremorine-M (Oxo-M), a selective agonist of  $\alpha_9\alpha_{10}$ -containing nAChRs, elicited inward currents that, reached values of 13% and 27%, respectively, of the maximum elicited by ACh (100 $\mu$ M).  $\alpha$ -bungarotoxin partially blocked ( $IC_{50}$  of 3,13nM) currents induced by Oxo-M (300  $\mu$ M) in a reversible manner, suggesting the presence of the  $\alpha_9\alpha_{10}$  subtype in chromaffin cells. The inhibitory effects of d-tubocurarine, strychnine, atropine and nicotine on Oxo-M-induced currents confirmed this interpretation. Ionic selectivity of the  $\alpha_9\alpha_{10}$  nAChRs study established the following permeability sequence for:  $Ca^{2+} \gg Cs^+ > Na^+ \geq Li^+ \gg Tris^+$ . Our results show that the  $\alpha_9\alpha_{10}$  receptor is highly permeable to  $Ca^{2+}$  and that is also capable of modulating  $\alpha_9\alpha_{10}$ -mediated currents. Just,  $Ca^{2+}$  ions entering the cell through  $\alpha_9\alpha_{10}$  nAChRs-associated channels were shown to promote exocytosis –as estimated by membrane capacitance monitoring- in chromaffin cells with the membrane potential held at -30mV.

**Key words:** Ligand-gated channel, nicotinic receptor, chromaffin cell, oxotremorine-M,  $Ca^{2+}$  permeability, secretory response, rat.

# Capítulo I: Introducción

Las células cromafines de la médula adrenal comparten origen embrionario y múltiples propiedades funcionales con las neuronas simpáticas postganglionares y representan un modelo celular útil para el estudio de los receptores nicotínicos (nAChRs) neuronales.

En los últimos años las células cromafines de la médula adrenal constituyen un modelo ampliamente utilizado en estudios sobre la neurosecreción. En la membrana de estas células se expresan nAChRs, que median la secreción de catecolaminas en respuesta a la ACh liberada por las terminaciones nerviosas del nervio esplácnico. Asimismo, estos nAChRs estarían implicados –junto con los de las neuronas simpáticas postganglionares– con la génesis de las alteraciones cardiovasculares (hipertensión arterial, arritmias, etc.), asociadas al hábito tabáquico.

A partir de los resultados de estudios farmacológicos, inmunocitoquímicos y moleculares, se ha propuesto la expresión en las células cromafines de la rata de diferentes tipos de nAChRs formados por diversas combinaciones de subunidades ( $\alpha_3\alpha_5\beta_4$ ,  $\alpha_3\alpha_5\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_2$ ,  $\alpha_7$ ). La reciente identificación de las subunidades nicotínicas  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  en células sensoriales del aparato auditivo y en neuronas de los ganglios raquídeos, motivaron a investigar la posible expresión nAChRs nicotínicos constituidos por estas subunidades en el parénquima adrenomedular.

Mediante la técnica electrofisiológica de “patch-clamp”, en su configuración de célula completa, se medirán las corrientes mediadas por los nAChRs en células cromafines cultivadas de rata.

Para iniciar el desarrollo del presente trabajo, se abordará la caracterización farmacológica, midiendo las corrientes de entrada en respuesta a la administración de agonistas nicotínicos no selectivos como lo constituyen la acetilcolina (ACh) y la nicotina (Nic). Así mismo, se pretende medir las respuestas inducidas con la colina (Cho), un compuesto que activa selectivamente los receptores nicotínicos  $\alpha_7$  y  $\alpha_9\alpha_{10}$ , y la oxotremorina-M (Oxo-M), un agonista del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$ . Valorándose las respuestas en cada caso mediante la elaboración de curvas dosis-respuesta y la expresión de resultados en función de la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>).

Otra herramienta farmacológica de gran importancia por su selectividad para determinados tipos de nAChRs, es la  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgTx), la cual está descrita

como un antagonista reversible de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$ . Por otro lado la peculiar farmacología de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  hace necesaria la utilización de otros agentes farmacológicos (antagonistas) tales como d-tubocurarina (d-Tub), estricnina (Est), atropina (Atr) y nicotina sobre corrientes inducidas por Oxo-M, en virtud de dichos resultados podremos concluir sobre la presencia de este tipo de receptores en las células cromafines de la rata.

De otro lado, se abordará la caracterización biofísica de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  estudiando la selectividad iónica de las corrientes inducidas por Oxo-M (300 $\mu$ M) mediante la medida de los potenciales de reversión bajo diferentes condiciones iónicas y aplicando la ecuación de Goldman Hodking y Katz (GHK) para voltaje.

La elevada permeabilidad a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , descrita para los nAChRs en otros modelos celulares, sugiere que podrían desempeñar un papel relevante en la regulación de algunos procesos dependientes de la elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la vecindad de la membrana plasmática. Asimismo, estudiaremos la modulación de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Finalmente, cabe señalar que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$  podría ser capaz de inducir la respuesta secretora en células cromafines de rata. Para la consecución de este estudio, se estimará la actividad secretora mediante el cambio en la capacitancia celular\* a diferentes potenciales de membrana y en respuesta a agonistas nicotínicos selectivos. Si se encuentran cambios en la capacitancia celular, estos resultados, permitirían atribuir a los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  un papel modulador de la respuesta secretora en este modelo celular.

## **Objetivos**

**Objetivo Principal:**

1. Determinar la presencia de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  en las células cromafines de la médula adrenal de la rata, siendo necesario para ello su caracterización farmacológica y su diferenciación del resto de los nAChRs en estas células.

**Objetivos Específicos**

1. Confirmar los resultados farmacológicos mediante identificación de los receptores nAChRs utilizando técnicas de biología molecular.
2. Caracterizar biofísicamente los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  de las células cromafines de la rata mediante el estudio de la selectividad iónica de los mismos y del efecto modulador del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.
3. Analizar alguna de las posibles consecuencias funcionales de la activación de receptores nicotínicos  $\alpha_9\alpha_{10}$ : Acoplamiento con la respuesta secretora de las células cromafines de la rata.

## **Capítulo II: Generalidades**



## **2.1. La glándula adrenal**

Las glándulas adrenales se encuentran localizadas en la zona antero-superior de los riñones de los mamíferos, estando irrigadas por las arterias adrenales superior, media e inferior, que proceden de las arterias frénica, aorta y aorta/arteria renal, respectivamente<sup>(1)</sup>. En la mayoría de las especies, la circulación venosa intraglandular confluye en las venas adrenolumbares derecha e izquierda para desembocar en las venas cava y renal, respectivamente.

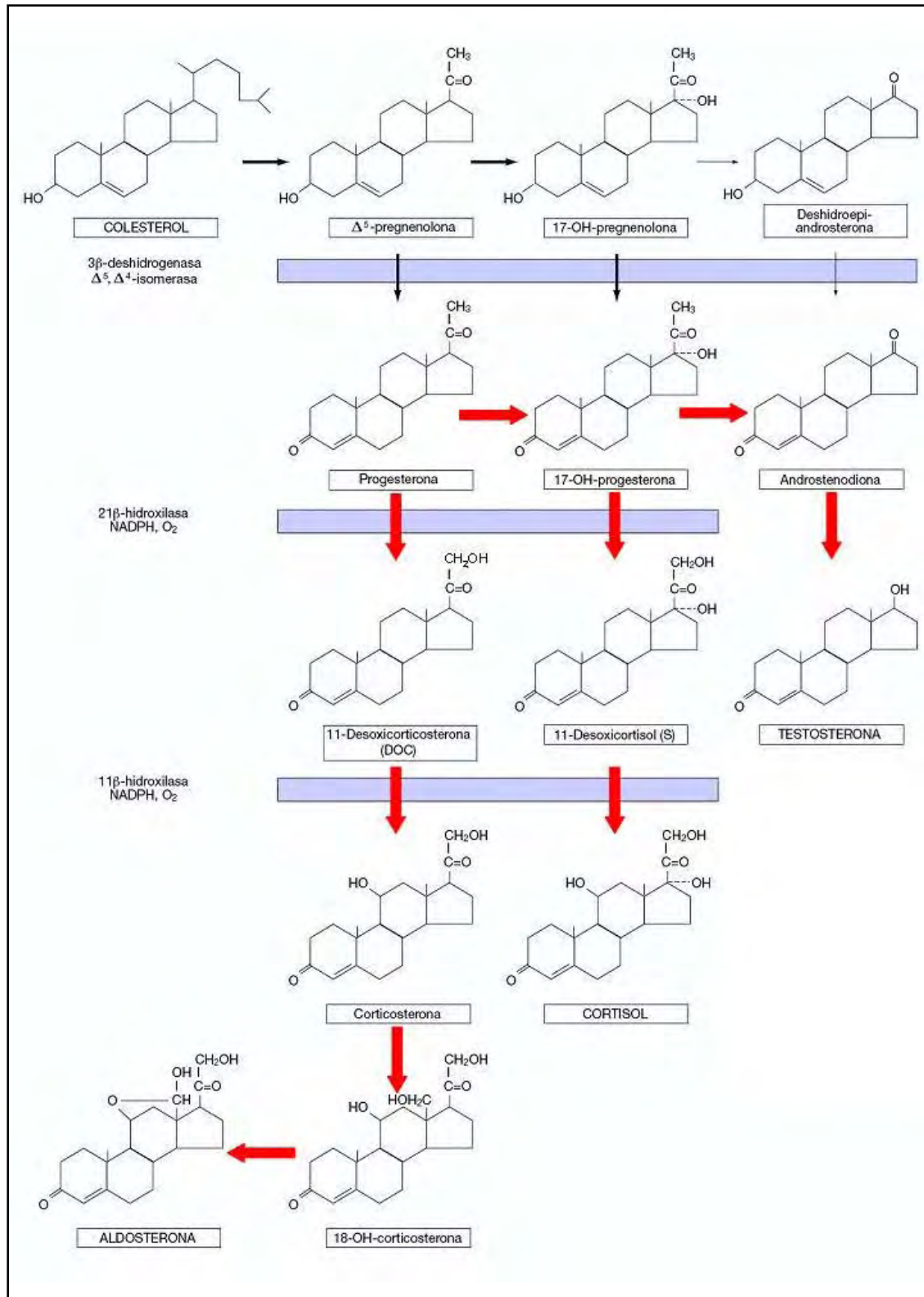
En la glándula adrenal se pueden distinguir dos regiones, la corteza y la médula, claramente diferenciadas desde el punto de vista funcional.

### **2.1.1 La corteza adrenal**

Se localiza en la periferia de la glándula y participa en la respuesta al estrés mediante la producción y liberación de corticosteroides. A tenor de sus efectos predominantes, los corticosteroides se clasifican en mineralcorticoides, representados fundamentalmente por la aldosterona, glucocorticoides, entre los que destaca el cortisol, y esteroides sexuales, fundamentalmente de naturaleza androgénica.

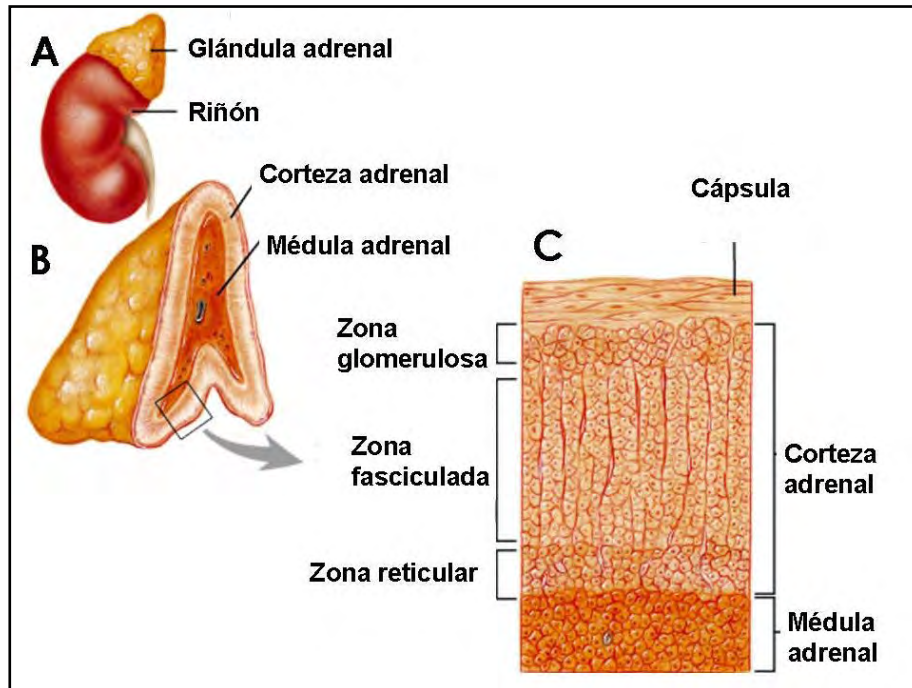
Los corticosteroides se sintetizan a partir de un precursor común, el colesterol, el cual es formado intracelularmente a partir de radicales acetato, o es incorporado por las células y transportado hasta la membrana mitocondrial interna mediante la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR). En la mitocondria, el colesterol es hidroxilado por la 20,22-desmolasa (CYP11A1), transformándose en pregnenolona. Una vez formada, la pregnenolona puede ser deshidrogenada y convertida en progesterona o hidroxilada para dar lugar a 17- $\alpha$ -hidroxipregnenolona<sup>(2)</sup>. Estas reacciones pueden llevarse a cabo en cualquier tejido productor de esteroides, mientras que las transformaciones siguientes tienen lugar específicamente en las células de la corteza adrenal (**Fig. 2.1**):

- 1) Progesterona  $\rightarrow$  desoxicorticosterona  $\rightarrow$  aldosterona.
- 2) Progesterona  $\rightarrow$  17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona  $\rightarrow$  desoxicortisol  $\rightarrow$  cortisol.
- 3) 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona  $\rightarrow$  androstenodiona  $\rightarrow$  testosterona.



**Figura 2.1.** Ruta biosintética de los corticosteroides. Las flechas en rojo indican las transformaciones que ocurren específicamente en la corteza adrenal.

En la corteza adrenal existen células especializadas en cada una de estas rutas biosintéticas, localizándose en tres zonas histológicamente bien definidas: la zona glomerulosa, la zona fasciculada y la zona reticular (**Fig. 2.2**).



**Figura 2.2.** Anatomía e histología de la glándula adrenal. **A.** Localización anatómica. **B.** Corte sagital de la glándula adrenal. **C.** Estructura histológica.

#### *a. Zona glomerulosa*

Constituye la porción externa de la corteza adrenal. Sus células, que funcionalmente se integran dentro del sistema renina-angiotensina, secretan mineralcorticoides en respuesta al incremento de la concentración plasmática de potasio ( $K^+$ ) o a la disminución del flujo sanguíneo renal<sup>(1)</sup>. La aldosterona actúa a nivel del túbulo contorneado distal promoviendo la reabsorción de sodio ( $Na^+$ ) e incrementando la excreción de  $K^+$ .

#### *b. Zona fasciculada*

Comprendida entre las zonas glomerulosa y reticular, sus células son responsables de la producción de glucocorticoides. Actúan como efectores primarios de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que se libera por la adenohipófisis en respuesta a dos

hormonas de origen hipotalámico, la hormona liberadora de corticotropina (ACTRH) y la arginina vasopresina (AVP).

Las células de la zona fasciculada forman parte de un sistema neuroendocrino conocido como “eje hipotalámico-hipofisario-adrenal”<sup>(1)</sup>. La ACTH estimula la producción y liberación de cortisol que modifica el metabolismo de los distintos principios inmediatos al aumentar la proteólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis y disminuir la utilización de la glucosa por las células del músculo esquelético y del tejido adiposo; como consecuencia de estas acciones, los glucocorticoides incrementan los niveles plasmáticos de glucosa, aminoácidos y triglicéridos.

### *c. Zona reticular*

Las células de la zona reticular se sitúan en la porción interna de la corteza, entrando en contacto con la región medular. Están especializadas en la síntesis de andrógenos como la testosterona, la dihidrotestosterona, la androstenodiona y la deshidroepiandrosterona. Los andrógenos aumentan la masa muscular, estimulan el crecimiento celular y son responsables de la aparición de los caracteres sexuales secundarios masculinos<sup>(1)</sup>.

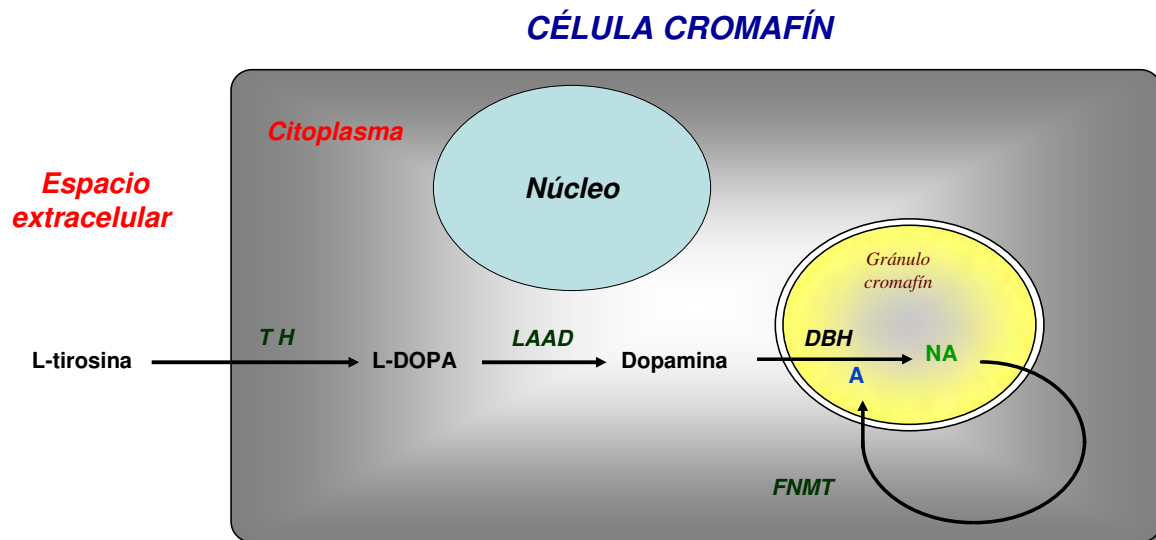
Por otra parte, los esteroides corticales actúan sobre las células adrenomedulares para controlar su diferenciación durante el desarrollo embrionario y regulan la síntesis y liberación de catecolaminas en el individuo adulto<sup>(3)</sup>. Asimismo, se ha encontrado que pueden modificar la actividad de los receptores nicotínicos, bien inhibiéndolos<sup>(4)</sup> o potenciándolos<sup>(5)</sup>, dependiendo de la especie estudiada.

### **2.1.2. La médula adrenal**

Está constituida por las células cromafines que representan la principal fuente de catecolaminas –adrenalina (A) y noradrenalina (NA)– del organismo. Las células cromafines deben el nombre a su afinidad por las sales de cromo que les confieren una coloración amarillo-parduzca al microscopio óptico. Derivan de la cresta neural y tanto anatómica como funcionalmente forman parte del sistema nervioso simpático, pudiendo considerarse neuronas ganglionares modificadas<sup>(6)</sup>.

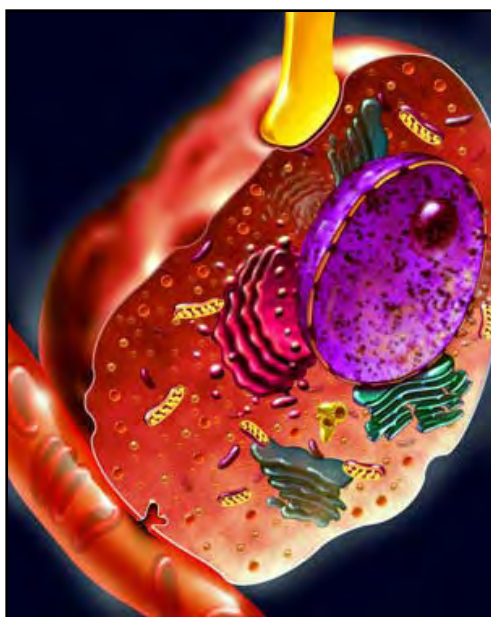
Las células cromafines sintetizan y almacenan en gránulos secretores, denominados cromafines (**Fig. 2.3**), grandes cantidades de catecolaminas que liberan al torrente

sanguíneo en situaciones de estrés como las que producen miedo o inducen a la lucha o a la huida<sup>(7)</sup>. Las catecolaminas circulantes contribuyen a la respuesta general de adaptación del organismo al estrés, provocando taquicardia, vasoconstricción, broncodilatación y la movilización de las reservas energéticas<sup>(8)</sup>.



**Figura 2.3.** Ruta biosintética de las catecolaminas. Se inicia en una reacción catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH) que transforma el aminoácido L-tirosina en dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La TH es una enzima específica de las células catecolaminérgicas que se localiza en el citoplasma. También en este compartimento celular tendría lugar el siguiente paso de la síntesis, consistente en la conversión de la L-DOPA en dopamina con la intervención de la L-aminoácido-aromático descarboxilasa (LAAD). La dopamina necesita ser captada por los gránulos para que la dopamina-β-hidroxilasa (DBH), una enzima situada en el interior de los gránulos promueva su conversión en noradrenalina (NA). Finalmente, y mediante la adición de un grupo metilo, la NA es transformada en adrenalina (A), con el concurso de la feniletanolamina-N-metiltransferasa (FNMT). Dado que la FNMT se encuentra en la fracción soluble del citoplasma, la NA debe salir de los gránulos para ser metilada, si bien la A es posteriormente captada por los gránulos para su almacenamiento.

Las células cromafines presentan una apariencia poligonal en la glándula intacta, pero adoptan la forma de una esfera de aproximadamente 15µM de diámetro cuando se aíslan mediante digestión enzimática. Habitualmente su núcleo se encuentra localizado excéntricamente, quedando ocupado el resto del citoplasma por 20000-30000 gránulos cromafines con diámetros entre 300 y 400nm<sup>(9,10)</sup> (**Fig. 2.4**).



**Figura 2.4.** Representación esquemática de una célula cromafín innervada por la terminación nerviosa de una fibra del nervio esplácnico (de color amarillo). Puede observarse el núcleo desplazado hacia uno de los extremos de la célula y diversas organelas (aparato de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondrias y gránulos cromafines) distribuidas en el citoplasma. En el ángulo inferior izquierdo aparece un vaso sanguíneo en el que la célula cromafín vertería los productos de su secreción.

Las células cromafines reciben innervación preganglionar a través del nervio esplácnico. Las terminaciones de las fibras de este nervio contienen dos tipos de vesículas sinápticas: unas pequeñas, claras y de naturaleza colinérgica y otras grandes y de núcleo denso que almacenan péptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la sustancia P (SP) y los opioides.

Durante la activación simpática, la acetilcolina (ACh) liberada por las terminaciones del nervio esplácnico se asocia con receptores colinérgicos (nicotínicos y muscarínicos) de la membrana de las células cromafines produciendo la despolarización celular y, eventualmente, la descarga de potenciales de acción con la consiguiente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje<sup>(6)</sup>. En conjunto, a esta secuencia de acontecimientos se la denomina “acoplamiento excitación-secreción”<sup>(11)</sup>.

La facilidad de cultivo a partir de la glándula adrenal de distintos mamíferos (vaca, gato, rata, perro, cobaya, etc.) y la posibilidad de emplear técnicas amperométricas<sup>(12)</sup> y de medida de la capacitancia celular<sup>(13)</sup> para el estudio de la exocitosis, han convertido a las células cromafines en un modelo ampliamente utilizado en estudios sobre la neurosecreción. Además, la posibilidad de realizar registros electrofisiológicos en rodajas de tejido adrenomedular<sup>(14,15,16)</sup> permite el análisis de la sinapsis esplacno–adrenal y la utilización de esta preparación también como modelo en estudios sobre la neurotransmisión.



## 2.2. La exocitosis de catecolaminas en las células cromafines de la médula adrenal

Hace ya más de 40 años que Douglas y Rubin (1961)<sup>(17)</sup> destacaron la importancia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en el acoplamiento excitación-secreción de catecolaminas por las células cromafines de la médula adrenal.

Tras la unión de la ACh al receptor nicotínico se va a producir la apertura del canal iónico asociado, penetrando a su través principalmente iones  $\text{Na}^+$  y en menor medida  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>(18)</sup>. La entrada de  $\text{Na}^+$  induce una despolarización de la membrana (potencial postsináptico excitador), suficiente para la apertura de canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje<sup>(19)</sup> cuya activación regenerativa conduce a la generación de un potencial de acción. Durante el mismo se va a producir también la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y en consecuencia la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular y la exocitosis<sup>(19)</sup>.

Una vez que se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes, el  $\text{Ca}^{2+}$  penetra en la célula por un doble gradiente, eléctrico y químico, ya que en el interior celular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre es de 50-200nM, es decir, unas 10000 veces menor que en el espacio intersticial (1mM). El incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico puede también deberse a su liberación de depósitos ubicados en organelas citoplasmáticas, fundamentalmente en el retículo endoplásmico y la mitocondria<sup>(20,21)</sup>.

Los gránulos cromafines constituyen el tipo de vesícula más abundante en las células cromafines. Su diámetro oscila entre 300-400nm<sup>(6,10,22)</sup> y contienen una serie de compuestos a una altísima concentración<sup>(23)</sup>, lo que otorga al gránulo un aspecto denso en las micrografías electrónicas ("Large Dense Core Vesicles").

En la médula adrenal, las dos principales catecolaminas, A y NA, se almacenan en células diferentes y juntamente con el adenosín trifosfato (ATP) en una proporción de 4 a 1. Sin embargo, las encefalinas y el neuropéptido Y aparecen únicamente en las vesículas adrenérgicas<sup>(24,25)</sup>, mientras que el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria<sup>(26,27)</sup>, la neurotensina<sup>(28,29)</sup> y la helodermina<sup>(30)</sup> se encuentran principalmente en las vesículas noradrenérgicas. Además, las vesículas adrenérgicas difieren de las noradrenérgicas en cuanto a su contenido en cromogranina A y de secretogranina II, dos proteínas constituyentes de la matriz intragranular. Así, las vesículas noradrenérgicas tienen un mayor contenido de secretogranina II y muy poca cantidad de cromogranina A en comparación con las vesículas adrenérgicas<sup>(31)</sup>.

Aparte de la NA y la A, en las vesículas secretoras se pueden encontrar otros tipos de aminas como la dopamina, la histamina y la serotonina, que se almacenan asociadas a ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Aproximadamente el 60% del  $\text{Ca}^{2+}$  y el 80% del contenido de ATP de estas células se encuentran en el interior de las vesículas cromafines. También almacenan enzimas como la DBH, y péptidos como la sustancia P (SP), la somatostatina, el VIP, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y el factor natriurético atrial.

Muchos de estos compuestos coalmacenados en las vesículas cromafines, como el ATP y diferentes péptidos, presentan funciones moduladoras de la respuesta secretora en células cromafines<sup>(23,32,33)</sup>, pudiendo actuar tanto de forma autocrina como paracrina.

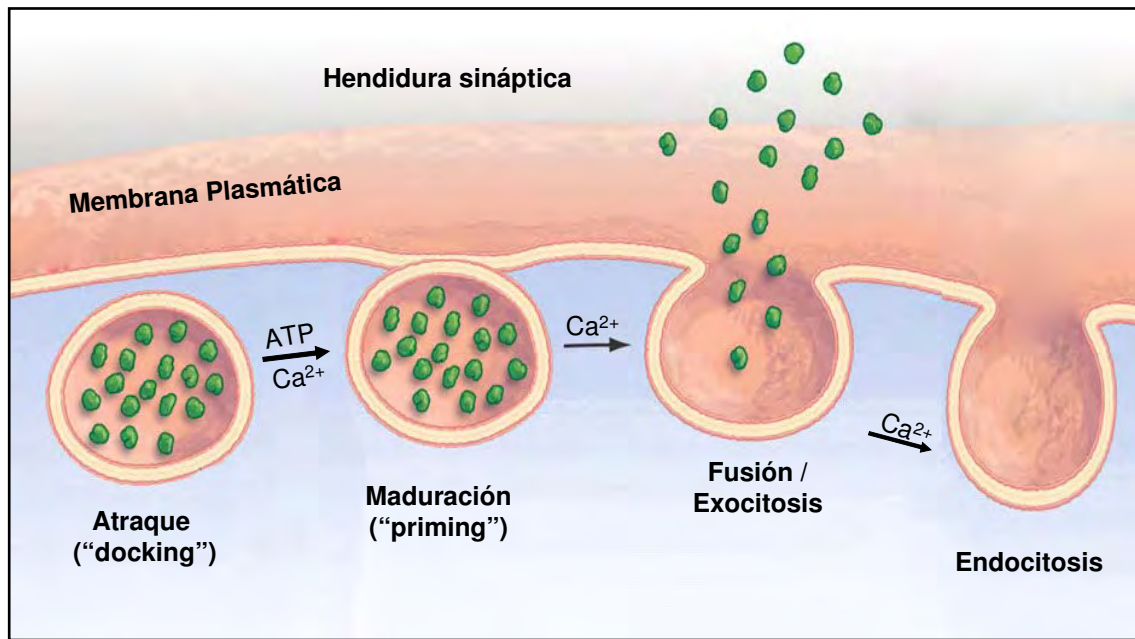
La exocitosis del contenido vesicular es la base de la comunicación intercelular en organismos multicelulares mediante la liberación de una amplia gama de moléculas que van a actuar como mensajeros extracelulares.

La exocitosis implica la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el espacio intersticial.

La fusión de membranas es un proceso que requiere de la participación de un gran número de proteínas, muchas de estas proteínas están muy conservadas a lo largo de la escala evolutiva. Las proteínas del complejo SNARE (del inglés "soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor") se localizan tanto en la vesícula secretora como en la membrana plasmática y son esenciales para el proceso de fusión de membranas.

La exocitosis constituye un caso particular de lo que se conoce como tráfico de membranas de las células eucarióticas que conlleva la formación y utilización de pequeñas vesículas de membrana. Existe una amplia evidencia bioquímica y morfológica de que con la exocitosis no finaliza el ciclo vital de las vesículas sinápticas sino que estas son recicladas intracelularmente una vez que su membrana es internalizada mediante un proceso denominado endocitosis (**Fig. 2.5**).





**Figura 2.5.** Etapas del ciclo de las vesículas sinápticas inmediatamente anteriores y posteriores a la exocitosis. El ciclo vital de las vesículas sinápticas no finaliza con la exocitosis (fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática) sino que las vesículas son recicladas intracelularmente, una vez que la membrana vesicular es internalizada mediante un proceso de endocitosis. Dentro de la célula, la vesícula endocítica se fusiona con un endosoma temprano desde el que se formarán nuevas vesículas que se cargan con el neurotransmisor y son subsiguientemente translocadas a la membrana celular. Algunas de estas vesículas entran en contacto ("docking") con la membrana plasmática, si bien sólo una fracción de ellas experimenta un proceso de maduración ("priming") que las faculta para ser liberadas mediante exocitosis. En el caso de la exocitosis regulada de las células excitables, la elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , como consecuencia de la entrada del mismo a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, es la señal que pone en marcha el proceso de fusión de membranas. El proceso de maduración vesicular y la endocitosis también son regulados por los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 2.2.1. Las proteínas del complejo de fusión

La membrana vesicular alberga más de diez familias de proteínas diferentes (**Tabla 2.1**)<sup>(34)</sup>. Queda fuera de los objetivos de esta revisión siquiera la mera reseña de todas ellas. Baste indicar que algunas como la SV2 resulta esencial para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de las vesículas<sup>(35)</sup>; otras, como las sinapsinas, median la interacción de las vesículas con el citoesqueleto<sup>(36)</sup>, lo que pudiera estar relacionado con los fenómenos de reclutamiento y translocación vesicular durante la estimulación prolongada, mientras que otras participarían en los procesos de maduración vesicular y de fusión de membranas. Entre estas últimas, se menciona a la sinaptobrevina –también llamada VAMP, acrónimo de "vesicle-associated membrane protein"–, una proteína integral de la membrana vesicular que forma el complejo de fusión<sup>(37)</sup>, y a la sinaptotagmina, que desde hace algunos años es considerada el receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  en la exocitosis regulada<sup>(38,39,40)</sup>.

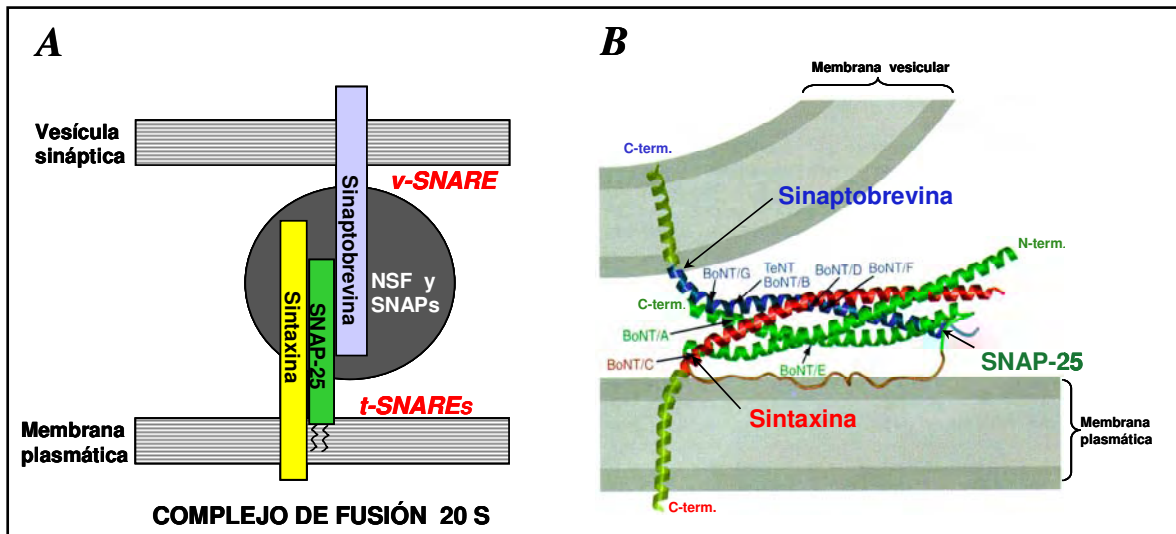
**Tabla 2.1.** Proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas y de los gránulos de secreción<sup>(41)</sup>.

Proteínas comunes	Proteínas específicas de los gránulos	Proteínas específicas de las vesículas sinápticas
Sinaptofisinas	Amidasa de péptidos	Sinapsinas
Synapogirinas	Citocromo b561	
Rab3A, B y C	Peptidasas (PC1, PC2, CPE, etc.)	
Sinaptotagmina 1 y 2	IA-2/fogrina	
SV2		
SVOP		
SCAMPS		
Sinaptobrevinas		
CSP (Cysteine string protein)		
Bomba de protones		
Transportador de cloro		
Transportador de Zinc (algunas vesículas)		

El denominado complejo de fusión está formado por la sinaptobrevina y dos proteínas localizadas preferentemente en la membrana plasmática, la syntaxina y SNAP-25 (“synaptosome-associated protein of 25 kDa”)<sup>(42)</sup>. Estas proteínas se asocian *in vitro* para formar un complejo ternario 7S, en relación a la velocidad con la que sedimenta al ser centrifugada una solución que lo contenga. Al complejo 7S se unen dos proteínas solubles, el NSF (“N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein”) y  $\alpha$ -SNAP (“soluble NSF attachment protein”), originando el llamado complejo 20S<sup>(42)</sup> (**Fig. 2.6 A**). Dado que  $\alpha$ -SNAP debe unirse al complejo 7S antes de que NSF pueda hacerlo, las proteínas de dicho complejo son conocidas como “SNAP receptors” o SNAREs. Además, y a tenor de su localización preferente en las distintas membranas destinadas a fusionarse, se denominan v-SNAREs (“vesicle SNAREs”) a las proteínas del complejo que como la sinaptobrevina se sitúan en la membrana de las vesículas, mientras que aquellas que pertenecen a la membrana plasmática reciben el nombre de t-SNAREs (“target SNAREs”). El NSF, las SNAPs y las SNAREs forman parte de una maquinaria molecular que se ha preservado a lo largo de la

escala evolutiva y que resulta esencial para los procesos de fusión de membranas<sup>(43)</sup>. El NSF es una ATPasa cuya actividad hidrolítica es estimulada por  $\alpha$ -SNAP y resulta necesaria para el desensamblaje del complejo de fusión. Por otra parte, la continua formación y ruptura del mismo constituye una propiedad inherente al funcionamiento de las SNAREs en el tráfico de membranas<sup>(44)</sup>.

Estudios de microscopía electrónica combinada con inmunofluorescencia han revelado la topología del complejo ternario 7S<sup>(45)</sup>. Las tres SNAREs se asocian entre sí siguiendo una orientación en paralelo con los dominios carboxilo-terminales de anclaje a la membrana disponiéndose contiguamente en el mismo extremo del complejo. Es importante señalar que esta orientación permitiría la formación de complejos entre proteínas situadas en la misma membrana (configuración *cis*) sobre los que actuaría el NSF para generar monómeros de SNAREs. Las SNAREs así liberadas reconstituirían nuevos complejos también entre membranas destinadas a fusionarse entre sí (ensamblaje productivo o en configuración *trans*). La energía liberada en la formación del complejo serviría para aproximar las dos membranas venciendo las correspondientes barreras de energía generadas por las cargas negativas de los fosfolípidos de membrana. Así mismo, la estructura cristalina del complejo ternario ha podido ser establecida mediante difracción de rayos X<sup>(46)</sup>. El complejo de fusión adopta la forma de un cilindro de 120 Å (1nm=10 Å) de longitud y diámetro transversal variable (**Fig. 2.6 B**). La porción central del mismo abarca cuatro segmentos homólogos de las 3 proteínas, de aproximadamente 60 aminoácidos y plegamiento alfa helicoidal, que son conocidos como regiones SNARE. La syntaxina y la sinaptobrevina poseerían un solo segmento SNARE, localizado en la región adyacente al dominio transmembrana carboxilo-terminal, mientras que SNAP-25 contendría dos, separados por una región conectora que incluye una serie de residuos de cisteína palmitoilados mediante los que se asocia a la membrana. El ensamblaje comenzaría por la formación de un complejo binario entre la syntaxina y SNAP-25 y continuaría mediante la asociación a ellas de la sinaptobrevina. La interacción se establecería inicialmente entre los dominios amino-terminales, que son los más distantes a la membrana, e iría avanzando mediante el entrecruzamiento (trenzado) de las regiones SNARE en dirección a las zonas de inserción en la membrana de la sinaptobrevina y la syntaxina.



**Figura 2.6.** El complejo proteico de fusión de membranas. **A.** Representación esquemática del complejo de fusión. El complejo está formado por la proteína vesicular sinaptobrevina y dos proteínas localizadas preferentemente en la membrana plasmática, la syntaxina y SNAP-25 (“synaptosome associated protein of 25 kDa”). Estas proteínas se asocian *in vitro* formando un complejo ternario 7S al que se unen dos proteínas solubles, el NSF (“N-ethylmaleimide sensitive fusion protein”) y  $\alpha$ -SNAP (“soluble NSF attachment protein”), originando el llamado complejo 20S. **B.** Estructura tridimensional del complejo de fusión obtenida mediante análisis de difracción de rayos X<sup>(46)</sup>. El complejo adopta la forma de un cilindro de 120 Å (1nm=10 Å) de longitud y diámetro transversal variable. La porción central del mismo abarca cuatro segmentos homólogos de las 3 proteínas, de aproximadamente 60 aminoácidos y plegamiento alfa helicoidal, que son conocidos como regiones SNAREs. La syntaxina y la sinaptobrevina poseen un solo segmento SNARE, localizado en la región adyacente al dominio transmembrana carboxilo-terminal, mientras que SNAP-25 contiene dos, separados por una región conectora que incluye una serie de residuos de cisteína palmitoilados mediante los que se asocia a la membrana. Se muestran también los lugares de actuación de las toxinas clostridiales: tetánica (TeNT) y botulínicas (BoNT) A, B, C, D, E, F y G. (Tomado de Cordero-Erausquin y col., 2000)<sup>(60)</sup>.

### 2.3. Estructura y función de los receptores nicotínicos

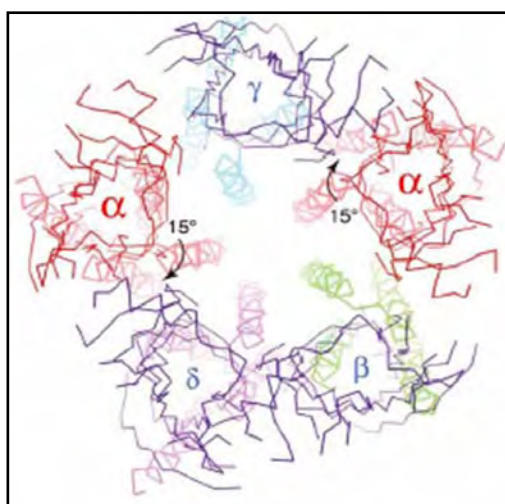
Los receptores nicotínicos para la ACh (nAChRs) son canales iónicos activados por ligando pertenecientes a la superfamilia de receptores formados por subunidades con cuatro segmentos transmembrana, que incluye también a los receptores ionotrópicos del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>), de la glicina y de la 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT<sub>3A</sub>)<sup>(47)</sup>.

Los primeros estudios sobre la naturaleza química y estructura de los nAChRs se realizaron en los años 70 del siglo pasado en el órgano eléctrico del pez *Torpedo* y de la anguila *Electrophorus*, que presentan una elevada concentración de estos receptores<sup>(48,49)</sup>. Posteriormente, ya en la década de los 80 fue posible clonar las subunidades que los componen<sup>(50)</sup>. Inicialmente se identificaron cuatro tipos diferentes de subunidades, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ <sup>(51)</sup> a las que se sumó más tarde la subunidad  $\epsilon$ , que se expresa exclusivamente en el músculo de mamíferos adultos. En la actualidad se reconoce la

existencia de diferentes subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_{10}$ ) y  $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ), una subunidad  $\gamma$ , una subunidad  $\delta$  y una subunidad  $\epsilon$ . Los nAChRs son oligómeros constituidos por cinco subunidades glucoprotéicas de 40-58kDa, idénticas (homómeros) o distintas (heterómeros), que se insertan en la membrana formando una roseta cuya zona central delimita el poro iónico. En su porción más estrecha el poro posee un diámetro de 2nm que permite el paso de pequeños cationes monovalentes y divalentes ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.)<sup>(52,53)</sup>.

Existen tres tipos de nAChRs con propiedades farmacológicas y biofísicas bien diferenciadas que, además, presentan una distribución anatómica característica: el receptor nicotínico muscular que se localiza en la placa motora; el receptor nicotínico neuronal periférico, presente en los ganglios vegetativos y en las células cromafines de la médula adrenal, y el receptor nicotínico neuronal central, localizado en diversas zonas del sistema nervioso central (SNC).

Los nAChRs presentes en la placa motora están constituidos por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$  ó  $\epsilon$  en la forma fetal ó adulta del receptor, respectivamente, que se asocian con una estequiometría de 2:1:1:1 (**Fig. 2.7**). Desde un punto de vista farmacológico se caracterizan por su elevada sensibilidad al agonista succinilcolina y la susceptibilidad al bloqueo por  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgTx) y pancuronio, que actúan como antagonistas competitivos.

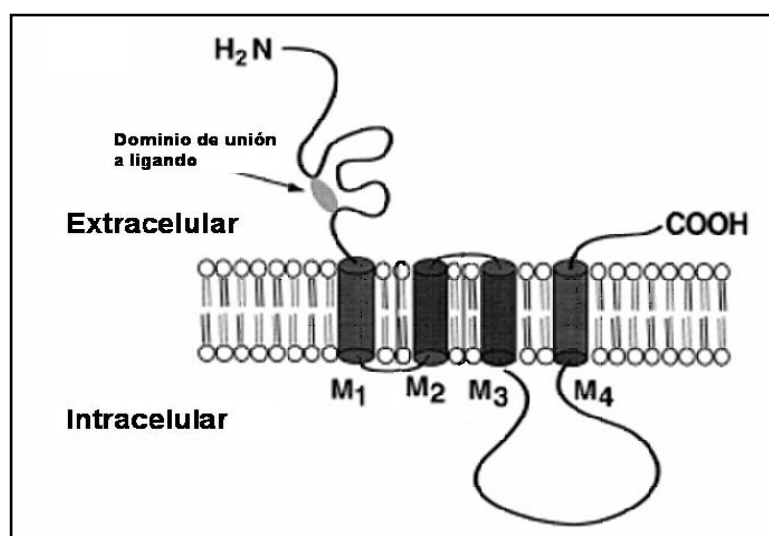


**Figura 2.7.** Estructura cuaternaria del receptor nicotínico de la unión neuromuscular. Se muestra la distribución en forma de roseta de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  alrededor del poro central (Tomada de Unwin, 2003)<sup>(54)</sup>.

Los nAChR neuronales, tanto centrales como periféricos, están formados por diferentes combinaciones de las subunidades  $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$  y  $\beta_2$ - $\beta_4$ , siendo, las subunidades  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  y  $\alpha_9$  capaces de formar homómeros funcionales, mientras que el resto de las subunidades  $\alpha$  dan lugar a receptores heteroméricos constituidos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ .

El análisis de las secuencias de todas las subunidades sugiere, basándose en estudios de hidrofobicidad, que están compuestas por un dominio N-terminal largo e hidrofílico de localización extracelular que alberga el sitio de unión al ligando, una porción transmembrana constituida por cuatro segmentos con plegamiento  $\alpha$ -helicoidal ( $M_1$ - $M_4$ ), de los que el segmento  $M_2$  delimita el poro iónico, y un dominio C-terminal, corto y extracelular<sup>(54,55)</sup> (**Fig. 2.8**).

Se han realizado un gran número de experimentos con el fin de determinar la ubicación del (los) sitio(s) de unión a la ACh en la estructura del receptor. Los aminoácidos que intervienen en la unión de la ACh en los nAChRs de la placa motora del *Torpedo* y de los vertebrados se encuentran en las interfases entre las subunidades  $\alpha_1$  y  $\delta$  y  $\alpha_1$  y  $\gamma$ ( $\epsilon$ ). De manera análoga, en los receptores nicotínicos heteroméricos neuronales existen dos sitios de unión localizados en las interfases entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ <sup>(55)</sup>. Asimismo, en los receptores homoméricos  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ , y  $\alpha_9$  llegarían a formarse cinco sitios de unión a la ACh idénticos entre sí<sup>(56)</sup>. La activación del nAChR requiere la unión de al menos dos moléculas de ACh que interactuarían con cooperatividad positiva para producir la apertura del poro iónico (**Fig. 2.9**).



**Figura 2.8.** Estructura secundaria de los nAChRs. Se puede observar un dominio extracelular con el sitio de unión al ligando, cuatro segmentos transmembrana  $M_1$ - $M_4$ , y el pequeño dominio C-terminal. El segmento  $M_2$  es el que delimita el poro iónico.



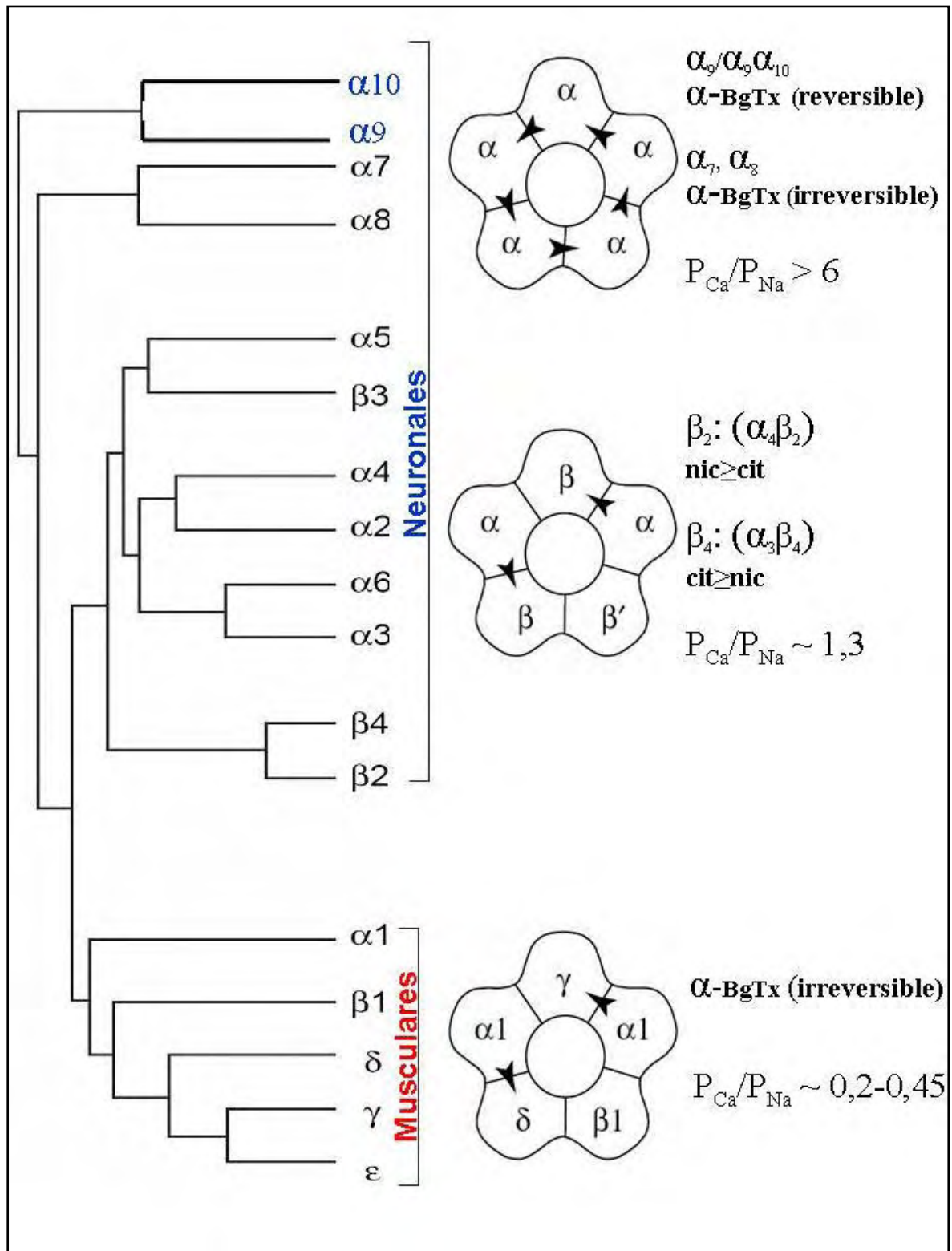
Las paredes del poro iónico están formadas por el segmento transmembrana  $M_2$  de cada una de las 5 subunidades que constituyen el receptor<sup>(54,55)</sup>. Este segmento determina la selectividad iónica y la conductancia del canal. Así, los receptores musculares embrionarios y adultos difieren en selectividad para el  $Ca^{2+}$  presentando razones de permeabilidad de  $P_{Ca}/P_{Na}$  de 0,2 y 0,45, respectivamente. Por su parte, los receptores neuronales poseen una elevada permeabilidad relativa al  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_{Na} > 1$ ), alcanzando valores máximos ( $P_{Ca}/P_{Na} > 6$ ) en el caso de los homoméricos  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ , y  $\alpha_9$ <sup>(57,58)</sup>.

La conductancia unitaria de los nAChR es de 20-60 picosiemens (pS), lo que equivaldría a un flujo de entrada de  $1 \times 10^7 - 3 \times 10^7$  iones por segundo en condiciones fisiológicas, con tiempos medios de apertura de 1–10 ms<sup>(59)</sup>. Los nAChRs de las células cromafines de la vaca presentan una conductancia de 40pS, mientras que en los de la rata y la cobaya es de 30pS<sup>(6)</sup>.

### 2.3.1. Los receptores nicotínicos neuronales

La clonación de las subunidades que forman los nAChRs y la expresión de las mismas en ovocitos, así como el empleo de técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica han posibilitado el conocimiento de la composición de subunidades, localización anatómica y perfil farmacológico y biofísico de los nAChRs neuronales.

Los nAChR neuronales están compuestos por nueve subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$ ) y tres subunidades  $\beta$  ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ) diferentes, que se asocian en múltiples combinaciones de cinco elementos (pentámeros) incluyendo un mínimo de dos subunidades  $\alpha$ . Si bien el número de receptores neuronales distintos que puede formarse es muy elevado, es posible reconocer tres subtipos mayoritarios: los receptores  $\alpha_4\beta_2$ , los  $\alpha_3\beta_4(\beta_2)$  y los  $\alpha_7$ , con propiedades bien diferenciadas. Así, el receptor  $\alpha_4\beta_2$ , predominante en el SNC, presenta una respuesta similar a Nic y a citosina (Cit)<sup>(60)</sup> y es bloqueado por la dihidro- $\beta$ -eritroidina (DH $\beta$ E,  $CI_{50}=0,1\mu M$ )<sup>(61)</sup>; por su parte, el receptor compuesto por las subunidades  $\alpha_3$  y  $\beta_4$  ó  $\beta_2$ , se localiza preferentemente en los ganglios simpáticos, responde mejor a la Cit que a la Nic<sup>(60)</sup> y es bloqueado selectivamente por las  $\alpha$ -conotoxina AuIB ( $\alpha_3\beta_4$ )<sup>(62)</sup> y MII ( $\alpha_3\beta_2$ )<sup>(63,64)</sup> y la metilcaconitina (MLA) ( $K_B$  en el rango nanomolar alto;  $>300nM$ )<sup>(65)</sup>. Por último, el receptor homomérico  $\alpha_7$  se expresa tanto en el SNC como en el periférico, es activado selectivamente por colina (Cho)<sup>(66)</sup> y GTS-21<sup>(67)</sup> y es bloqueado selectivamente por la MLA (a concentraciones inferiores a 300nM), la  $\alpha$ -conotoxina ImI y por  $\alpha$ -BgTx de manera irreversible<sup>(47,68,69,70,71)</sup> (**Fig. 2.9**).



**Figura 2.9.** Árbol filogenético de las 17 subunidades conocidas del nAChR. Asimismo, se muestra la localización anatómica, estequiometría, perfil farmacológico y permeabilidad relativa al  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_{Na}$ ) de los principales tipos de nAChRs. Las puntas de flecha representan los sitios de unión a la ACh (Tomado con modificaciones de Cordero-Erausquin y col., 2000)<sup>(60)</sup>.



### 2.3.2. Los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal

Los nAChRs neuronales se expresan tanto en SNC como en tejidos periféricos, entre los que se incluye la médula adrenal; a pesar de los numerosos estudios realizados empleando aproximaciones tanto farmacológicas como de biología molecular, actualmente no se conoce con exactitud la composición de subunidades de los nAChRs presentes en la médula adrenal de las diferentes especies de mamíferos de interés en biomedicina (rata, hombre, ratón, vaca, perro, gato y cerdo). No obstante, existen evidencias de que las células cromafines de la rata expresan las subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_7$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_4$ <sup>(64,72)</sup>, mientras que en la vaca han sido identificadas solamente las subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_7$  y  $\beta_4$ <sup>(73,74,75)</sup>. Desde el punto de vista farmacológico, experimentos realizados con toxinas que bloquean selectivamente los receptores  $\alpha_7$  ( $\alpha$ -BgTx y  $\alpha$ -conotoxina ImI), indican que tanto estos receptores como los probablemente formados por la asociación  $\alpha_3\alpha_5\beta_4$  están implicados en la respuesta secretora de catecolaminas de las células cromafines bovinas<sup>(65)</sup>.

### 2.3.3. Los receptores nicotínicos $\alpha_9\alpha_{10}$

Son los más recientemente identificados, habiéndose encontrado en un reducido número de estructuras como las células del epitelio sensorial de la cóclea (IHC y OHC) y del laberinto<sup>(71,76,77,78)</sup>, epitelio y bulbo olfatorio<sup>(76,79)</sup>, ganglio del trigémino<sup>(80)</sup>, los ganglios raquídeos<sup>(81)</sup>, corazón<sup>(82)</sup>, placenta, linfocitos<sup>(83,84)</sup>, queratinocitos<sup>(85)</sup>, adipocitos<sup>(86)</sup>, espermatozoides<sup>(87)</sup> células endoteliales y músculo liso vascular<sup>(88,89)</sup> y músculo esquelético de la lengua<sup>(71,76,90)</sup>. Sin embargo, no han podido ser descritos en SNC.

Mientras que las distintas subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_8$ ) muestran homologías de secuencia entre el 48 y el 70%, la similitud existente con la  $\alpha_9$  y la  $\alpha_{10}$  es en cualquier caso inferior al 40%. Por su parte, la homología entre la  $\alpha_9$  y la  $\alpha_{10}$  es del 57%. La presencia de dos cisteínas (en posiciones 192 y 193) implicadas en la unión de la ACh y su característica estructura secundaria –con cuatro segmentos transmembrana y un gran dominio N-terminal extracelular– permitieron la adscripción de las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  al grupo de los canales iónicos activados por ligando. Asimismo, a tenor del reducido grado de homología observado en la estructura primaria, las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  constituirían un grupo filogenéticamente distinto tanto de los nAChRs musculares como de los neuronales (**Fig. 2.9**), presentando además, importantes similitudes con los receptores de GABA (tipos A y C), glicina y 5-HT<sub>3</sub>.

Al ser expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, las subunidades  $\alpha_9$  pueden combinarse entre sí formando receptores homoméricos funcionales<sup>(76)</sup>. La inyección de las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  se asocia a la aparición de respuestas de magnitud 1000 veces superior a las observadas tras la expresión en solitario de la subunidad  $\alpha_9$ , lo que indica que los dos tipos de subunidades se combinan para constituir receptores heteroméricos funcionales<sup>(71,91)</sup>, hecho que también podría acontecer de manera fisiológica, ya que las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  se colocan en la mayoría de las estructuras donde han sido identificadas. Asimismo, el receptor recombinante  $\alpha_9\alpha_{10}$  presenta propiedades farmacológicas y biofísicas prácticamente idénticas al receptor nicotínico que media la transmisión sináptica entre las fibras olivococleares eferentes y las células ciliadas de la cóclea donde es bien conocido que las únicas que se expresan son la  $\alpha_9$  y la  $\alpha_{10}$ . Se han realizado estudios sobre poblaciones de receptores con mutaciones de una valina a treonina en la posición 13 del segmento transmembrana  $M_2$ , evidenciándose que esta mutación incrementa la sensibilidad del receptor por la ACh, si bien el efecto funcional de estas mutaciones en las subunidades  $\alpha_9$  y la  $\alpha_{10}$  no es equivalente; ello conlleva a modificaciones distintas de la concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) para la ACh en función de las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  en el receptor, lo que ha llevado a proponer que el receptor nicotínico pentamérico recombinante  $\alpha_9\alpha_{10}$  tendría una estequiometría  $(\alpha_9)_2(\alpha_{10})_3$ <sup>(92)</sup>.

Los receptores homoméricos  $\alpha_9$  y los heteroméricos  $\alpha_9\alpha_{10}$  presentan una farmacología peculiar entre los nAChRs, ya que además de ser activados por el agonista muscarínico Oxo-M, son los únicos nAChRs inhibidos por la Nic; así mismo pueden ser bloqueados por sustancias tan diversas como la estricnina (Est), la bicuculina (Bic), el ondansetrón, la atropina (Atr), la  $\alpha$ -BgTx (de forma reversible) y la MLA (rango nanomolar). Los nAChRs  $\alpha_9$  homoméricos y los heteroméricos  $\alpha_9\alpha_{10}$  no exhiben marcadas diferencias en sus perfiles farmacológicos, excepto una sensibilidad 10 veces superior a la del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$  para el efecto bloqueante de la Nic.<sup>(71)</sup>

El receptor recombinante homomérico  $\alpha_9$  expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* es altamente permeable al  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_{Na} \sim 9$ ), que, no obstante, es capaz de bloquear el poro iónico de manera dependiente de voltaje<sup>(93)</sup>. De manera similar, el receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$ , expresado en ovocitos, también es muy permeable al  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_{Na} \sim 10$ ), y además está intensamente modulado, tanto de forma inhibidora como potenciadora por cationes divalentes como el  $Ca^{2+}$  ó el  $Ba^{2+}$  <sup>(71,94)</sup>.

Asimismo, recientemente Gomez-Casati y col. (2005)<sup>(95)</sup> han determinado que la  $P_{Ca}/P_{Na}$  del receptor nativo de las células ciliadas internas de la cóclea de la rata es de 8, y han confirmado en esta preparación el efecto modulador de tipo dual (potenciador e inhibidor) que ejerce el  $Ca^{2+}$  extracelular. Además, empleando de forma simultánea técnicas fluorométricas (microfluorometría de Fura-2) y electrofisiológicas (configuración de célula completa de la técnica del “patch-clamp”), Fucile y col. (2006)<sup>(58)</sup> han estimado que la entrada fraccional de  $Ca^{2+}$  a través del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$  de la rata expresado en células hipofisarias GH4Cl es del 22% al potencial de membrana de -50mV y en condiciones iónicas semejantes a las fisiológicas (2mM de  $Ca^{2+}$  y 2mM de  $Mg^{2+}$ ).

A diferencia de los receptores  $\alpha_9$ , que son bloqueados por concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$  ó  $Ba^{2+}$ , los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  son potenciados inicialmente por  $Ca^{2+}$  ó  $Ba^{2+}$  (hasta 0,5mM; este rango de concentraciones se amplía en células de pollo<sup>(96)</sup> y bloqueados por concentraciones superiores de ambos cationes. En ausencia  $Ca^{2+}$ , las corrientes a través del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$  son minúsculas. Los dos tipos de receptores son bloqueados por  $Mg^{2+}$  con una concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de 0,2mM en 0,5mM de  $Ca^{2+}$  para el receptor nativo<sup>(95)</sup>;  $CI_{50}$  de 0,33mM en 1,3mM de  $Ca^{2+}$  y  $CI_{50}$  de 0,38mM en 0,5mM  $Ca^{2+}$  para el receptor recombinante<sup>(94)</sup>.

### ***2.3.4. Papel del receptor $\alpha_9\alpha_{10}$ en las células ciliadas de la cóclea***

Las células ciliadas (“hair cells”) de la cóclea de los vertebrados tienen la capacidad de detectar estímulos sonoros y traducirlos en señales eléctricas. En los mamíferos hay dos tipos de células ciliadas involucrados en este proceso: las células ciliadas internas (“inner hair cells”, IHCs) y las células ciliadas externas (“outer hair cells”, OHCs). Las IHCs son los transductores acústicos primarios y reciben la mayoría de la inervación aferente, en tanto que las OHCs están involucradas en la amplificación del sonido y reciben predominantemente inervación eferente colinérgica desde el complejo olivar en el tronco cerebral.

Las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  son los principales componentes de los receptores nicotínicos que median la transmisión sináptica entre las fibras olivococleares eferentes y las OHCs<sup>(71,76,97)</sup>.

En la sinapsis entre las fibras eferentes y las OHCs, la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$ , activa canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  con la consiguiente hiperpolarización de la membrana plasmática<sup>(98,99)</sup>, la consecuencia fisiológica de ello es

una reducción del movimiento de la membrana basilar, alterándose, por tanto, el rango dinámico de la audición. Las fibras colinérgicas que inervan las OHCs de la cóclea de los mamíferos disminuyen la actividad del nervio auditivo en dos escalas de tiempo: la primera, del orden de milisegundos, es responsable de la modulación del nervio auditivo durante la estimulación acústica de alta frecuencia y está mediada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor nicotínico que activa corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la segunda, de acción lenta (del orden de segundos) protegería al oído frente a una sobreestimulación, mediante mecanismos todavía mal conocidos<sup>(100)</sup>.

#### 2.4. La técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (“patch-clamp”)

La técnica de fijación de voltaje en parches de membrana, o “patch-clamp”, permite mantener de forma estable el potencial de toda la membrana de una célula (configuración de célula completa) o solamente la de una pequeña porción de la misma (configuración de parche adherido o escindido), y registrar la corriente generada por el flujo de iones a través de los canales presentes en la membrana (modo de fijación de voltaje). Alternativamente esta técnica también puede ser empleada para medir la modificación del potencial de membrana en respuesta a la inyección de pulsos de corriente (modo de fijación de corriente)<sup>(101)</sup>. La técnica del parche de membrana se basa en la formación de un sello de alta resistencia eléctrica ( $1\text{G}\Omega$ ; “gigasello”) y mecánica entre el borde de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula. Para ello, la micropipeta se llena con una solución interna, cuya composición puede variar en función de la corriente iónica que vaya a estudiarse y que, además de iones inorgánicos, puede contener mediadores intracelulares tales como el adenosín monofosfato cíclico ( $\text{AMP}_\text{C}$ ), el ATP o el guanosín trifosfato (GTP). El registro de las corrientes iónicas resultantes de la actividad de los canales iónicos inducida bien por la administración de un pulso de voltaje (canales dependientes de voltaje) o de fármacos (canales activados por ligando) requiere de la fijación del potencial de membrana mediante la inyección a través de la micropipeta de corriente de idéntica magnitud pero de sentido contrario a la que fluye a través de los canales iónicos.

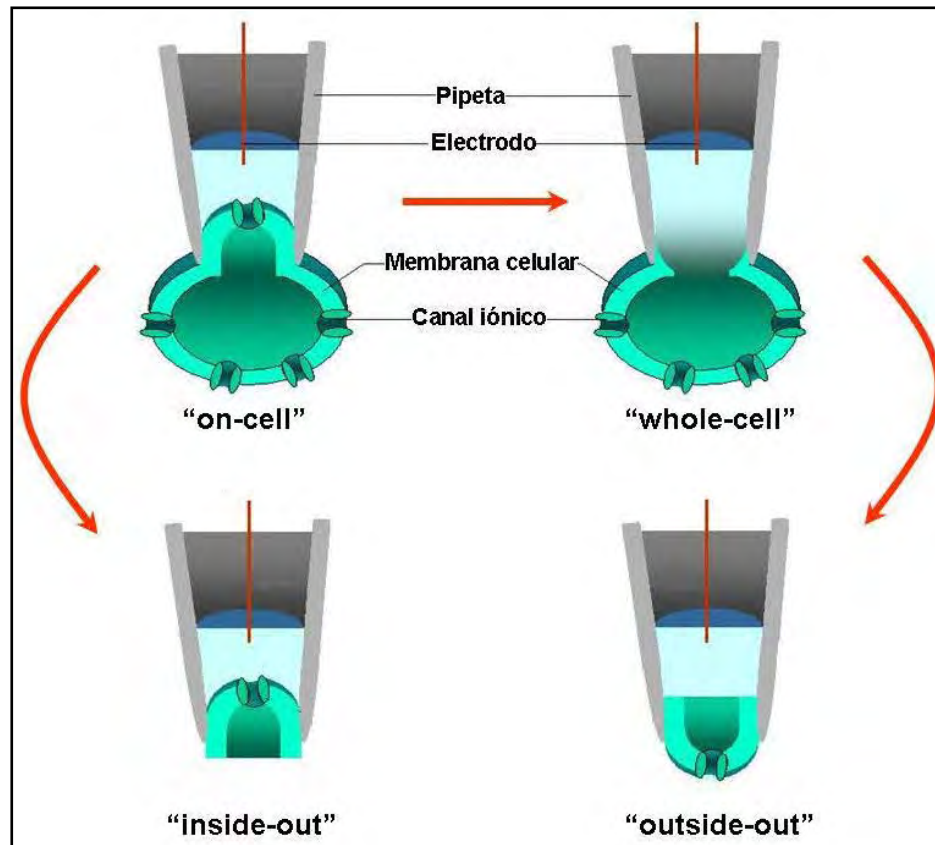
La técnica presenta cuatro configuraciones distintas (**Fig. 2.10**):

1. Configuración de parche sobre célula entera o parche adherido (“on-cell patch”). Permite registrar las corrientes unitarias generadas por la activación de un número reducido de canales (1-10) en un parche de membrana.

2. Configuración de célula completa (“whole cell”). Permite registrar la corriente iónica resultante de la actividad de los canales presentes en la práctica totalidad de la membrana celular. Es la configuración utilizada en nuestro trabajo para la caracterización farmacológica de los nAChRs presentes en las células cromafines de la médula adrenal de la rata y el estudio de su selectividad iónica.
3. Configuración de parche escindido, interior hacia afuera (“inside-out patch”). La cara citosólica de un parche de membrana queda expuesta a la solución extracelular, mientras que la cara externa queda en contacto con la solución contenida en la pipeta de registro. Permite la rápida modificación de la solución en contacto con la cara interna de la membrana, favoreciendo el estudio de la modulación de la actividad de los canales iónicos por segundos mensajeros ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{AMP}_\text{C}$ , etc.)
4. Configuración de parche escindido, exterior hacia afuera (“outside-out patch”). Corresponde a la situación inversa a la del parche interior hacia afuera (“inside-out patch”).

La configuración de célula completa (“whole-cell”) permite un control adecuado del medio intracelular, debido al rápido intercambio difusional de pequeñas moléculas (sales inorgánicas, nucleótidos, péptidos, etc.) entre la solución que rellena la micropipeta y el citosol. Si bien esta configuración brinda al experimentador la posibilidad de definir la composición del medio intracelular –particularmente, en relación al contenido de moléculas de pequeño tamaño de la forma más conveniente a los propósitos de su investigación –por ejemplo, el registro de una determinada corriente iónica mientras se bloquean las restantes–, supone también la pérdida por dilución (“washout”) de una serie de sustancias de naturaleza no siempre conocida y que pueden resultar esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares, incluyendo la actividad de algunos canales iónicos (fundamentalmente los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje) o la exocitosis. La principal consecuencia de esta pérdida por dilución de algunos componentes celulares es la desaparición (“run-down”) de las respuestas dependientes de dichas funciones, con la consiguiente reducción del tiempo que el investigador dispone para su estudio. A fin de minimizar estos problemas se desarrolló una variante de la configuración de célula completa, denominada del parche perforado, en la que se emplea anfotericina B (o nistatina) para acceder eléctricamente al interior de la célula desde la configuración de

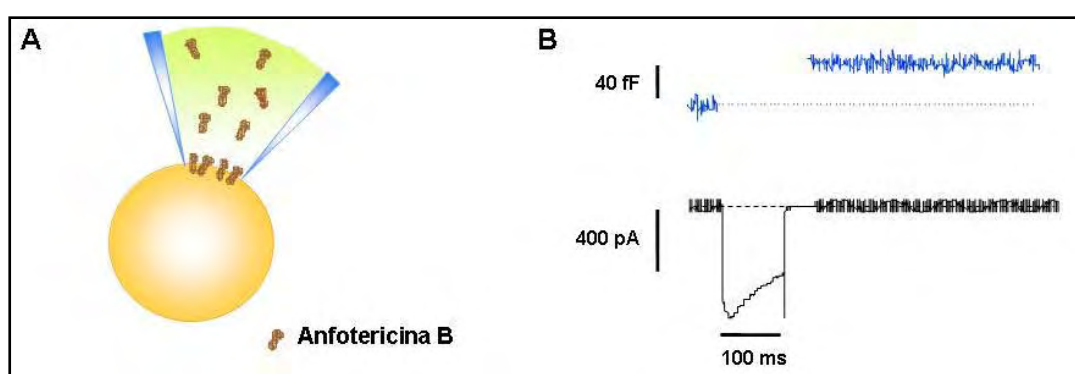
parche adherido sin necesidad de romper la membrana contenida en la pipeta. La anfotericina B y la nistatina son moléculas anfipáticas capaces de insertarse en las membranas celulares y modificar su permeabilidad mediante la formación de canales iónicos.



**Figura 2.10.** Configuraciones de la técnica de parche de membrana ("patch-clamp"). Todas ellas parten de la formación de un sello inicial de alta resistencia entre el borde de una pipeta de vidrio y la membrana celular (configuración "on-cell"). Partiendo de esta configuración, cuando se retira la pipeta de vidrio es posible escindir un pequeño fragmento de la membrana celular que permanece fuertemente unido a la micropipeta, obteniéndose la configuración de parche adherido ("on-cell patch"). Alternativamente, es posible aplicar un pulso de succión en el interior de la pipeta en la configuración "on-cell" al objeto de que se rompa la membrana contenida en la pipeta. Se accede así a la configuración de célula completa ("whole-cell") en la que se establece una continuidad eléctrica entre el interior celular y la pipeta. Basta entonces con retirar la pipeta de la célula para que se forme una vesícula membranosa en la que la superficie expuesta al medio extracelular corresponde a la cara externa de la membrana plasmática (configuración "outside-out").

La configuración de célula completa se alcanza lentamente desde la de célula adherida cuando se utiliza la variante del parche perforado debido al tiempo requerido por las moléculas de anfotericina B para difundir hasta la membrana celular, incorporarse a la misma y constituir canales iónicos. Este proceso puede monitorizarse de forma periódica al

traducirse electrofisiológicamente en una disminución de las resistencias de acceso y en el incremento progresivo de las corrientes capacitativas originadas por pulsos rectangulares de muy pequeña amplitud (2-5mV). En la mayoría de las células pueden obtenerse unos valores de las resistencias de acceso inferiores a 50MΩ al cabo de 20 minutos, procediéndose entonces a registrar las corrientes iónicas objeto de la investigación planteada.



**Figura 2.11.** Variante de parche perforado de la configuración de célula completa de la técnica de “patch-clamp”. A. En el parche de la membrana en contacto con la solución de anfotericina B se forman poros permeables a iones monovalentes, preservando la composición del medio intracelular en lo que respecta a iones polivalentes, enzimas, mediadores y otras macromoléculas. B. La técnica del parche perforado permite el registro prolongado (hasta una hora) tanto de los cambios en la capacitancia celular (trazo superior) como de la actividad eléctrica de la membrana (corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el trazo inferior).

Los poros formados por estos compuestos son permeables a cationes monovalentes y al  $\text{Cl}^-$  (los cationes monovalentes son 9 veces más permeables que el  $\text{Cl}^-$ ), pero excluyen a iones multivalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Mg}^{2+}$ . Estas sustancias son añadidas a la solución que rellena la micropipeta de registro y se incorporan a la membrana plasmática una vez alcanzada la configuración de célula adherida. Una vez permeabilizado el parche de membrana situado en el interior de la pipeta, es posible controlar el potencial de la célula y, en consecuencia el registro de las corrientes iónicas a través de los canales de su membrana. Dado que los canales de anfotericina B impiden el paso de iones polivalentes, mediadores intracelulares y en general a cualquier sustancia con peso molecular superior 200 ó un diámetro superior a 0,8nm (dependiendo de la temperatura y pH del medio, así como de la concentración de la anfotericina B)<sup>(102)</sup>, se preserva en buena medida la composición del medio intracelular, resultando posible con el empleo de esta técnica el

registro prolongado de corrientes iónicas y el de los cambios en la capacitancia como indicador de la actividad secretora celular<sup>(103,104)</sup>. (**Fig. 2.11**).

## **2.5. Motivación del estudio realizado**

El reciente descubrimiento de receptores nicotínicos formados por las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  en las células del epitelio sensorial del sistema auditivo, ha motivado su búsqueda en otras estructuras en las que podrían desempeñar un papel inhibidor de la actividad eléctrica celular. Las células cromafines de la médula adrenal son un modelo celular ampliamente utilizado en estudios sobre la neurosecreción, que disponen en su membrana celular de nAChRs que median la secreción de catecolaminas en respuesta a la ACh liberada por las terminaciones nerviosas del nervio esplácnico. Asimismo, estos nAChRs estarían implicados –junto con los de las neuronas simpáticas postganglionares– con la génesis de las alteraciones cardiovasculares (hipertensión arterial, arritmias, etc.), asociadas al hábito tabáquico.



## **Capítulo III: Materiales y métodos**

### 3.1. Materiales y equipos

#### 3.1.1. Reactivos y productos químicos

La procedencia de los productos químicos utilizados en los métodos descritos en esta sección aparece recogida en la **Tabla 3.1**.

**Tabla 3.1.** Relación de compuestos y reactivos utilizados

Uso y categoría	Reactivo	Casa comercial
<b>Cultivo de células cromafines</b>	Solución salina de Hanks, Penicilina, Estreptomicina, Anfotericina B, Medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), Polilisina  Colagenasa  Suero fetal bovino	Sigma-Aldrich Co. España  Biowhittaker, UK  Worthington, EEUU
<b>Registros Electrofisiológicos</b> Agonistas nicotínicos	ACh, Cho, Nic, Oxo-M  GTS-21	Sigma-Aldrich Co. GB  Cedido por Dr. W. Kem (Univ. Florida)
Antagonistas nicotínicos	MLA, $\alpha$ -BgTx, Atr, Est, d-Tub, apamina	Sigma-Aldrich Co. España
Sales y otros	CsGlu, KGlu, NaCl, KCl, TrisCl, CsCl, LiCl, HEPES, ATP.Na <sub>2</sub> , GTP.Li <sub>2</sub> , CsOH, glucosa, anfotericina B, DMSO  EGTA, MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , Cs <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  HCl, NaOH	Sigma-Aldrich Co. España    Fluka Chemica, Suiza  Merck, Alemania
<b>Experimentos de PCR</b>	Oligonucleótidos cebadores  RNAsin  Transcriptasa reversa de virus murino Noloney  ADN polimerasa Taq	Sigma-Aldrich Co. España   Promega, GB  Gibco, GB  Qiagen, GB

**Tabla 3.2.** Composición de la solución salina de Hank

Compuesto	Concentración (g/L)
KCl	0,4
KH <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (anhidro)	0,06
NaHCO <sub>3</sub>	0,35
NaCl	8,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	0,04788
D-Glucosa	1

**Tabla 3.3.** Composición del medio de Dulbecco modificado por Eagle

Compuesto	Concentración (g/L)
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,2650
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	0,0001
MgSO <sub>4</sub>	0,09767
KCl	0,4
NaHCO <sub>3</sub>	3,7
NaCl	6,4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,109
L-Arginina•HCl	0,084
L-Cistina•2HCl	0,0626
L-Glutamina	0,584
Glicina	0,030
L-Histidina•HCl•H <sub>2</sub> O	0,042
L-Isoleucina	0,105
L-Leucina	0,105
L-Lisina•HCl	0,146
L-Metionina	0,030
L-Fenilalanina	0,066
L-Serina	0,042
L-Treonina	0,095
L-Triptófano	0,016
L-Tirosina•2Na•2H <sub>2</sub> O	0,10379
L-Valina	0,094
Cloruro de Cho	0,004
Ácido fólico	0,004
mio-Inositol	0,0072
Niacinamida	0,004
Ácido D-Pantoténico•½Ca	0,004
Piridoxina•HCl	0,004
Riboflavina	0,0004
Tiamina•HCl	0,004
D-Glucosa	1
Rojo de fenol•Na	0,0159
Ácido pirúvico•Na	0,11

### **3.1.2. Material biológico**

En este estudio se utilizaron cultivos primarios (2 a 4 días) de células cromafines de ratas Sprague Dawley, de ambos sexos y edades comprendidas entre 6 y 8 semanas (200 – 300g) procedentes del Animalario de la Universidad Complutense de Madrid con Número de Registro 28079-15ABC de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid (España).

### **3.1.3. Material fungible**

- Placas petri de 35mm de diámetro (Iwaki Brand Scitech Div., Japón)
- Cubreobjetos de 10mm de diámetro (Menzel GMBH & Co, Alemania)
- Micropipetas de vidrio de capilares de boro-silicato con diámetros interno y externo de 1,5 y 1,8mm, respectivamente (Kimax, Witz Scientific, USA)

### **3.1.4. Equipos**

- Campana de flujo laminar (Hera Safe, Heraeus, Alemania)
- Centrífuga Universal 32R (Hettich, Alemania)
- Incubador (Hera cell, Heraeus, Alemania)
- Amplificador de “patch-clamp” EPC9 (Heka Elektronik, Lambrecht, Alemania)
- Microscopio invertido Zeiss Axiovert 100
- Electroválvulas controladas con el programa PULSE 9.7
- Ordenador Apple Macintosh 8200/120
- Estirador vertical programable modelo PP830 (Narishige, Japón)
- Microforja MF830 (Narishige, Japón)
- Osmómetro VAPRO® 5520 (Wescor, EEUU)

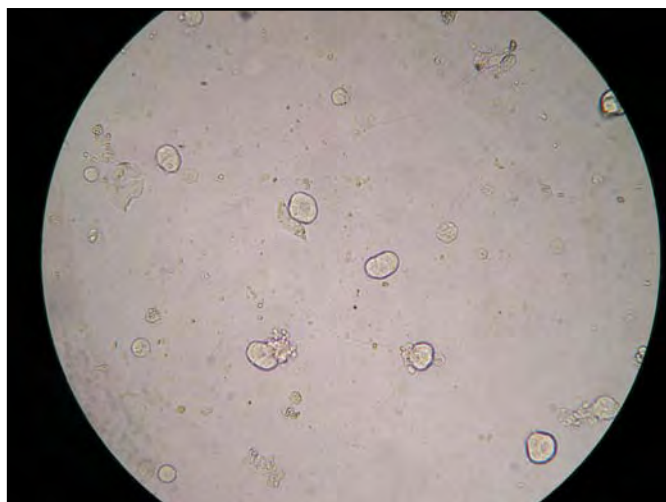
### **3.1.5. Programas informáticos**

- Igor Pro 4.08 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA, 2003)
- GraphPad Prism V. 4.0 (San Diego, USA, 2003)
- PULSE 9.7 (Heka Elektronik, Lambrecht, Alemania)

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de la rata

Las células cromafines fueron aisladas de las glándulas adrenales de ratas *Sprague Dawley*, de ambos sexos y edades comprendidas entre 6 y 8 semanas (200 – 300g) procedentes del animalario de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales fueron sacrificados mediante concusión y sometidos a una laparotomía media con el objetivo de extraer las glándulas adrenales en el menor tiempo posible. Una vez extraídas, las glándulas fueron sumergidas en solución salina de Hanks (**Tabla 3.2**) fría (4°C) a la que se había adicionado un preparado antibiótico a base de penicilina, estreptomicina y anfotericina B (100u.mL<sup>-1</sup>, 0,1mg.mL<sup>-1</sup> y 0,25µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). A continuación, bajo campana de flujo laminar (Hera safe, Heraeus, Alemania) se procedió a la descapsulación de las glándulas seguida de la disección, extracción y fraccionamiento de las médulas adrenales. Posteriormente, se inició el proceso de digestión con colagenasa (500 u.mL<sup>-1</sup>) a 37°C, durante 30 minutos con agitación mecánica cada 10 minutos mediante pipeta Pasteur. Tras centrifugar la suspensión celular a 800 rpm en una centrífuga Universal 32R (Hettich, Alemania) a 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM; Dulbecco's modified Eagle's Medium) (**Tabla 3.3**) suplementado con suero fetal bovino (5%) y con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (100u.mL<sup>-1</sup>, 0,1mg.mL<sup>-1</sup> y 0,25µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente)<sup>(63)</sup>.



**Figura 3.1.** Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de la rata. Imagen de microscopia de campo claro (400X).

Finalmente, se depositaron alícuotas de 0,5mL de la suspensión celular a una densidad de 30000 células.mL<sup>-1</sup> sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH & Co, Alemania) previamente tratados con polilisina (1mg.mL<sup>-1</sup> durante 30 minutos) y colocados en el interior de placas Petri (3-4 cubreobjetos por placa) de 35mm de diámetro (Iwaki Brand Scitech Div., Japón), que fueron rellenadas con medio de cultivo y transferidas a un incubador (Hera cell, Heraeus, Alemania) a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El rendimiento medio de los cultivos fue de 600 000 células procedentes de seis glándulas (**Fig. 3.1**). En el presente estudio se emplearon células mantenidas en cultivo durante dos a cuatro días.

### ***3.2.2. Registro de corrientes iónicas y de la capacitancia de la membrana con la técnica de “patch-clamp”: Análisis farmacológico de las respuestas***

Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador de “patch-clamp” modelo EPC9 (Heka Elektronik, Lambrecht, Alemania) controlado desde un ordenador Apple Macintosh 8200/120 mediante el programa PULSE 9.7 (Heka Electronics, Lambrecht, Alemania). Se emplearon micropipetas de vidrio fabricadas con un estirador vertical programable modelo PP830 (Narishige, Japón) a partir de capilares de boro-silicato con diámetros interno y externo de 1,5 y 1,8mm, respectivamente (Kimax, Witz Scientific, USA). Las puntas de las pipetas fueron recubiertas con cera y pulidas mediante calor con una microforja MF830 (Narishige, Japón), quedando posteriormente almacenadas protegiéndolas del polvo y otros agentes hasta el momento de su utilización en los experimentos. Una vez rellenadas con la solución interna y sumergidas en la solución externa (véase más adelante) las pipetas presentaron una resistencia de 2,5 a 3,5MΩ.

La solución interna fue preparada semanalmente en tanto que la extracelular se preparó diariamente. Las osmolaridades de ambas soluciones se midieron con un osmómetro VAPRO® 5520 (Wescor, EEUU) con el que se controló que las soluciones intracelulares siempre tuvieran una osmolaridad comprendida entre 280 y 300mOsm y las extracelulares de 300 a 320mOsm.

Unos minutos antes del comienzo del experimento, las células, adheridas a un cubreobjetos, fueron transferidas desde el incubador hasta una cámara de metacrilato adaptada para la perfusión, que se situó sobre la platina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert 100 (**Fig. 4.1 A**).

Las células cromafines fueron continuamente superfundidas (a una velocidad de 2 mL.min<sup>-1</sup>) durante los experimentos con una solución salina (solución extracelular).

Para la caracterización farmacológica de las corrientes nicotínicas y el estudio de su naturaleza iónica se empleó la configuración de célula completa de la técnica de “patch-clamp” en la modalidad de fijación de voltaje, con monitorización continua de la capacitancia celular y de las resistencias en serie, que nunca excedieron los 20 MΩ. El valor de la capacitancia media de una muestra de las células empleadas en los experimentos fue de 5,67±0,14pF (n=10). Para los experimentos en los que se valoró la actividad secretora a través de los cambios en la capacitancia celular, se recurrió a la variante de parche perforado con anfotericina B de la configuración de célula completa (**Fig. 2.11**). Solamente aquellas células en las que las resistencias de acceso al cabo de 20min de haber alcanzado la configuración de célula adherida cayeron por debajo de 50MΩ fueron empleadas en este tipo de experimentos.

Las soluciones de registro variaron dependiendo del tipo de experimentos en las que se emplearon. Así, en los experimentos de caracterización farmacológica de los nAChRs y modulación por Ca<sup>2+</sup> extracelular, la solución interna tuvo la siguiente composición (mM): glutamato de Cs<sup>+</sup> (CsGlu) 145, NaCl 8, HEPES 10, EGTA 10, MgCl<sub>2</sub> 1, ATP.Na<sub>2</sub> 2, GTP.Li<sub>2</sub> 0,3 (ajustada a pH de 7,2 con CsOH). Asimismo, la solución externa estuvo compuesta por (mM): NaCl 145, KCl 2,8; CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, glucosa 10 (ajustada a pH de 7,2 con HCl ó NaOH). Cuando el diseño experimental lo requirió, se procedió a la modificación de la concentración de Ca<sup>2+</sup> extracelular sin corregir el cambio de osmolaridad que pudiera producirse.

Las soluciones internas empleadas en el estudio de la selectividad iónica de los nAChRs tuvieron la composición siguiente (mM): NaCl 141, XCl 1, HEPES 10, EGTA 10, ATP.Na<sub>2</sub> 2, GTP.Li<sub>2</sub> 0,3 (ajustada a pH de 7,2 con NaOH), en la que X puede ser Na<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> ó Tris<sup>+</sup>; la solución externa tuvo la siguiente composición (mM): NaCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, sacarosa 20 (ajustada a pH 7,2 con NaOH), en las que el Na<sup>+</sup> pudo ser parcialmente sustituido (véase la sección de resultados) por Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> o tris<sup>+</sup>. Dado que el Cs<sup>+</sup> extracelular produce una marcada inhibición de la corriente inducida por ACh en las células cromafines de la rata<sup>(105)</sup> y que el tris<sup>+</sup> presenta una limitada permeabilidad a través de los nAChRs<sup>(53,106)</sup> se procedió a la sustitución parcial del Na<sup>+</sup> extracelular por Cs<sup>+</sup> (81mM) y tris<sup>+</sup> (41mM) en aquellos experimentos en los que se evaluó la permeabilidad

relativa a los iones monovalentes al objeto de poder registrar corrientes nicotínicas suficientemente grandes a potenciales próximos al  $E_{rev}$ .

Finalmente, para el estudio del acoplamiento entre la corriente nicotínica y la respuesta secretora, evidenciada mediante los cambios en la capacitancia celular, se utilizó la siguiente solución interna (mM):  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  90, CsCl 55, NaCl 8,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 15, anfotericina B  $0,4\text{mg.mL}^{-1}$  (ajustada a pH 7,2 con CsOH). Esta solución fue mantenida a  $-4^\circ\text{C}$  en agua helada y preparada cada dos horas mediante la adición de una alícuota de una solución concentrada de anfotericina B ( $50\text{mg.mL}^{-1}$ ) a 0,5mL de solución interna, homogenizándola mediante sonicación\* con émbolo en frío.

La solución concentrada de anfotericina B ( $50\text{mg.mL}^{-1}$ ) fue preparada en DMSO mediante sonicación con émbolo en frío (3 pulsos de 10s a intervalos de 10s). Esta solución se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  empleándose durante un máximo de 3 días.

La solución externa empleada en estos experimentos, fue la siguiente (mM): NaCl 140, KCl 2,8;  $\text{CaCl}_2$  1 ó 10,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, sacarosa 10 (ajustada a pH 7,2 con NaOH).

La capacitancia celular fue estimada a partir de las corrientes generadas en respuesta a una onda de voltaje sinusoidal de 1KHz de frecuencia y de 50mV de amplitud<sup>(107)</sup>. Dicha onda fue aplicada durante los 100ms previos y los 500ms siguientes a la estimulación eléctrica –mediante un pulso despolarizante rectangular– o farmacológica –mediante la administración de agonistas nicotínicos– de la célula. El cambio en la capacitancia de la membrana inducido por los distintos estímulos se calculó substrayendo el valor medio de la capacitancia durante los 100ms previos a la estimulación, del valor medio alcanzado por dicho parámetro en los 500ms posteriores al estímulo. Cuando se emplearon estímulos despolarizantes, se excluyeron del análisis los 100ms siguientes a la despolarización a fin de evitar la influencia del movimiento de cargas en el interior de la membrana producido por la recuperación de la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje<sup>(108)</sup>.

Las corrientes capacitativas fueron adquiridas a una frecuencia de 16KHz y la capacitancia calculada a 1KHz, mientras que las corrientes nicotínicas así como las generadas por la despolarización de la membrana fueron filtradas a 2KHz y digitalizadas a 4KHz para su posterior análisis y representación gráfica.

Los diferentes agonistas y antagonistas nicotínicos utilizados fueron administrados en el medio extracelular, directamente sobre la célula en estudio, mediante un sistema de



aplicación local de fármacos impulsado por la gravedad y regulado por electroválvulas controladas con el programa PULSE 9.7. Las disoluciones de estos fármacos en la solución externa fueron preparadas diariamente a partir de soluciones acuosas concentradas ( $10^{-1}$  –  $10^{-3}$ M) de los mismos. La nicotina constituyó una excepción ya que fue inicialmente disuelta en etanol. La concentración final de este agente en la solución externa fue siempre inferior al 1%.

La estimulación con los fármacos agonistas se realizó mediante pulsos breves (100-500ms), administrados tres veces consecutivas a intervalos de 45s, calculándose posteriormente la media de las tres respuestas obtenidas (pulsos 1º, 2º y 3º). El efecto de los fármacos antagonistas también se evaluó por triplicado en cada experimento, superfundiéndose durante 45s antes de ser coaplicados localmente con el agonista (pulsos 4º, 5º y 6º). Finalmente, el agonista fue administrado tres veces más durante el período de lavado del antagonista con objeto de estudiar la reversibilidad del efecto de este último (pulsos 7º, 8º, y 9º) (**Fig. 4.1**).

El análisis de las corrientes -amplitud y cinética- fue realizado mediante el programa PULSE 9.7, mientras que para la representación del curso temporal de las respuestas a lo largo del experimento se empleó el programa Igor Pro 4.08 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA, 2003).

Las curvas concentración-respuesta a agonistas y antagonistas se ajustaron mediante el programa GraphPad Prism V. 4.0 (San Diego, USA, 2003), calculándose la concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) y la concentración inhibidora 50 ( $CI_{50}$ ), que representan la concentración de fármaco necesaria para producir el 50% de la respuesta, estimuladora o inhibidora, máxima, respectivamente.

### ***3.2.3. Estudio de la selectividad iónica de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la rata***

El estudio de la selectividad iónica de los nAChRs se basó en la determinación del potencial de reversión ( $E_{rev}$ ) de las corrientes nicotínicas bajo distintas condiciones iónicas y en el cálculo subsiguiente de las razones de permeabilidad iónica relativas al  $Na^+$  ( $P_X/P_{Na}$ ) mediante el empleo de la ecuación de campo constante de Goldman, Hodgkin y Katz (GHK) para voltaje<sup>(109)</sup>.

$$E_{rev} = (RT / F) \cdot \ln \left[ \frac{[Na^+]_e + P_x/P_{Na}[X^+]_e}{[Na^+]_i + P_x/P_{Na}[X^+]_i} \right]$$

donde  $P_x/P_{Na}$  representa la permeabilidad relativa al  $Na^+$  de distintos cationes monovalentes,  $[X^+]$  representa la actividad iónica de las sales de dichos iones en las soluciones extracelular (e) e intracelular (i) utilizadas, R es la constante molar de los gases, F es la constante de Faraday y T es la temperatura absoluta ( $RT/F$  es 25,69mV a 25°C).

Para el cálculo de la permeabilidad relativa del  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_{Na}$ ), la ecuación de GHK para voltaje fue modificada como se muestra a continuación<sup>(109)</sup>:

$$E_{rev} = (RT / F) \cdot \ln \left[ \frac{[Na^+]_e + P_x/P_{Na}[X^+]_e + 4P_{Ca}/P_{Na}[Ca^{2+}]_e}{[Na^+]_i + P_x/P_{Na}[X^+]_i + 4P_{Ca}/P_{Na}[Ca^{2+}]_i e^{FE_{rev}/RT}} \right]$$

Al objeto de determinar los  $E_{rev}$  se realizaron curvas intensidad de corriente-voltaje (I/V) para cada una de las condiciones iónicas características del ión cuya permeabilidad deseaba estimarse. El  $E_{rev}$  fue calculado por interpolación de los valores de potencial entre los que se observó un cambio en el sentido de la corriente nicotínica. La diferencia entre ambos potenciales fue siempre menor de 10mV. Los valores de  $E_{rev}$  así obtenidos fueron modificados en función de los potenciales de difusión ( $V_{PD}$ ) de los distintos pares de soluciones –interna y externa– empleados.

#### a. Cálculo de las actividades iónicas

Los valores de actividad iónica (a) utilizados en la ecuación de GHK se obtuvieron por multiplicación de los respectivos coeficientes de actividad iónica ( $\gamma$ ) por la concentración milimolar de las sales  $[X^+]$  respectivas:

$$a = \gamma [X^+]$$

A su vez los coeficientes de actividad iónica (**Tabla 3.4**) fueron calculados por interpolación entre los valores aportados por Robinson y Stokes (1959)<sup>(110)</sup> para concentraciones de las sales en solución acuosa próximas a las utilizadas en nuestras disoluciones. Una excepción a este procedimiento, la constituyó el cálculo de la actividad iónica de la disolución de Tris<sup>+</sup>, que se realizó mediante el empleo de la ecuación de Debye-Huckel:

$$\log \gamma = -z^+z^-/A\sqrt{I}$$

donde  $\gamma$  es el coeficiente de actividad iónica,  $z$  es la valencia del ión que se considere,  $A$  es una constante empírica para el agua equivalente a 0,509 a 25°C, e  $I$  es la fuerza iónica de la solución que se calculó a partir de la fórmula:

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$$

donde  $m$  es la concentración molar de los iones predominantes en la solución y  $z$  la valencia de los mismos.

**Tabla 3.4.** Coeficientes de actividad iónica ( $\gamma$ ) de las diferentes sales a las concentraciones existentes en las soluciones empleadas en este trabajo.

	Concentración nominal (mM)									
	1	10	41	59	65,8	81	99	130	140	142
<b>NaCl</b>	0,996	0,892	-	0,794	0,791	-	0,776	-	0,759	0,748
<b>CsCl</b>	0,960	-	-	-	-	0,765	-	-	-	-
<b>LiCl</b>	0,940	-	-	-	-	-	-	0,774	-	-
<b>TrisHCl</b>	0,970	-	0,667	-	-	-	-	-	-	-
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,960	0,320	-	-	-	-	-	-	-	-

*b. Cálculo de los potenciales de difusión de los diferentes pares de soluciones*

Las magnitudes de los potenciales de difusión ( $V_{PD}$ ) pueden ser obtenidas experimentalmente o ser calculadas. Los valores calculados no difieren significativamente de los obtenidos mediante mediciones directas, que, por otra parte, están sujetas a

numerosas fuentes de error<sup>(111)</sup>. Por ello, se optó por calcular los  $V_{PD}$  para los diferentes pares de soluciones empleadas utilizando la ecuación general de Henderson, modificada por Barry en 1970 para incluir las actividades iónicas<sup>(112)</sup>. Así, para N iones polivalentes, el  $V_{PD}$  resulta de la diferencia entre el potencial de la solución externa ( $E^S$ ) respecto al de la interna contenida en la pipeta ( $E^P$ ), quedando expresado por la siguiente ecuación:

$$V_{PD} = E^S - E^P = (RT/F) \cdot S_F \cdot \ln \left\{ \frac{\sum z_i^2 u_i a_i^P}{\sum z_i^2 u_i a_i^S} \right\}$$

$$\text{donde } S_F = \frac{\sum [(z_i u_i)(a_i^S - a_i^P)]}{\sum [(z_i^2 u_i)(a_i^S - a_i^P)]}$$

en las que  $u$ ,  $a$  y  $z$  representan la movilidad iónica relativa a la del  $K^+$ , la actividad iónica y la valencia (incluyendo el signo) de cada especie iónica, respectivamente. Aunque la ecuación es de valor general pues se puede utilizar para muy diversas combinaciones de sales, aporta un valor aproximado del potencial de difusión bajo las situaciones experimentales ya que emplea asunciones que no siempre están bien definidas electroquímicamente.

La movilidad iónica relativa al  $K^+$  ( $uX^+/uK^+$ ) es la relación entre la movilidad de una especie iónica determinada ( $uX^+$ ) y la movilidad del  $K^+$  ( $uK^+$ ). La movilidad iónica puede obtenerse mediante medición directa o cálculo a partir de la conductancia límite equivalente ( $\Lambda^0$ ), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$uX^+ = \Lambda^0 / (z/F^2),$$

donde  $z$  y  $F$  tienen los significados habituales.

Los valores de las movilidades relativas de los distintos iones presentes mayoritariamente en estas soluciones fueron tomados de los calculados por Robinson y Stokes (1959)<sup>(110)</sup> a excepción del correspondiente al  $\text{tris}^+$ , que corresponde al medido por Ng y Barry (1995)<sup>(113)</sup> (**Tabla 3.5**).

**Tabla 3.5.** Movilidades iónicas relativas al  $K^+$  ( $uX^+/uK^+$ ) de los iones presentes en las soluciones empleadas en este trabajo.

Ión	$uX^+/uK^+$
$Cs^+$	1,050
$K^+$	1,000
$Na^+$	0,682
$Li^+$	0,525
$Ca^{2+}$	0,405
$Mg^{2+}$	0,361
$Cl^-$	1,039
$Tris^+$	0,400

Finalmente, el valor calculado del  $V_{PD}$  fue sustraído del valor de potencial de reversión ( $V_M$ ) obtenido experimentalmente para calcular el potencial de reversión corregido ( $E_{rev}$ ), que es el utilizado en la ecuación de GHK:

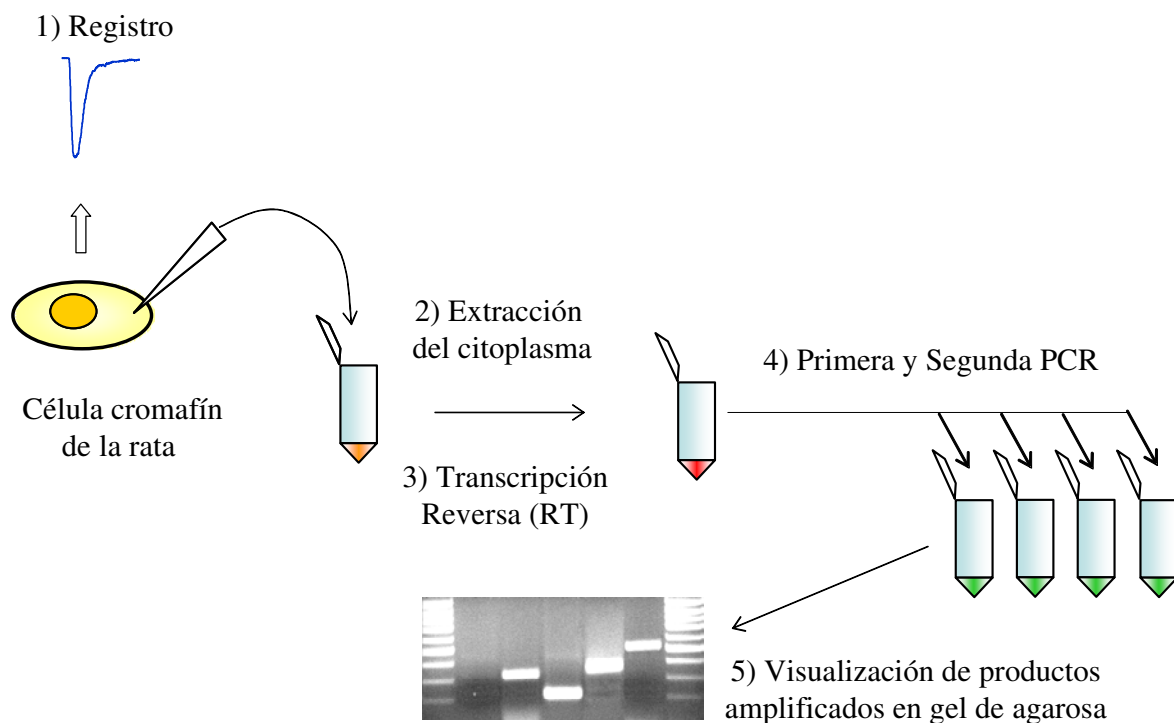
$$E_{rev} = V_M - V_{PD}$$

#### ***3.2.4. Estudio de la modulación por $Ca^{2+}$ extracelular de los receptores nicotínicos de las células cromafines de rata.***

Se evaluaron los efectos de una serie de concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular (0,3; 1; 3; 10 y 20mM) sobre las respuestas de corriente inducidas por ACh (100 $\mu$ M), que activa todos los tipos de nAChRs, y de Oxo-M (300 $\mu$ M), que activa preferentemente los receptores del tipo  $\alpha_9\alpha_{10}$ . Para ello, las células fueron superfundidas durante períodos de 1 minuto con soluciones conteniendo distintas concentraciones de  $Ca^{2+}$  antes de ser estimuladas con el agonista en presencia de la misma concentración de  $Ca^{2+}$ . Las respuestas de corrientes obtenidas fueron normalizadas respecto a la respuesta alcanzada en cada una de las células en 1mM de  $Ca^{2+}$ . Al objeto de evaluar la dependencia de voltaje del posible efecto modulador del  $Ca^{2+}$  extracelular se compararon las respuestas a dos potenciales de fijación ( $V_h$ ) diferentes: -90 y +40mV

### 3.2.5. Análisis de ARNm de células cromafines de rata mediante RT-PCR

Se siguió un protocolo similar al descrito por Baldelli y col. (2004)<sup>(114)</sup> y Andrés-Mateos y col., (2005)<sup>(115)</sup>. Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador de “patch clamp” modelo EPC9 (Heka Elektronik, Lambrecht, Alemania), controlado desde un ordenador Apple Macintosh 8200/120 mediante el programa PULSE 9.7 (Heka Elektronik, Lambrecht, Alemania), en la configuración de célula entera. La micropipeta de vidrio se rellenó con una solución intracelular libre de RNAsas, con la siguiente composición en mM: (NaCl 142; EGTA 10; HEPES 10) ajustada a pH 7,2. Después de aproximar la pipeta de patch a la célula, y realizar el correspondiente sello, se fijó el potencial de membrana a -70mV. Una vez culminado el registro electrofisiológico programado, se procedió a la aspiración del citoplasma tratando de evitar el arrastre de núcleo.



**Figura 3.2.** Esquema que representa el protocolo experimental seguido para registrar las corrientes a través de nAChRs nativos y, posteriormente, amplificar por RT-PCR las subunidades nicotínicas expresadas en la misma célula cromafín.

El citoplasma fue expelido en un tubo eppendorf que contenía una solución con sNTPs, cebadores al azar, DTT, enzima transcriptasa reversa (MLV-RT) y RNAsina, todo este proceso se llevó a cabo a 4°C. después de realizar la RT durante toda la noche, se realizó una primera ronda de PCR de los cADNs usando *Taq* y simultáneamente, todas las

parejas de cebadores sentido y antisentido de las subunidades nicotínicas que se especifican en la **Tabla 3.6**. Cada pareja de cebadores fue diseñada en exones diferentes de la subunidad en cuestión con objeto de evitar que una posible contaminación con ADN genómico falseara la amplificación del ADNc. En todos los casos se utilizó una temperatura de hibridación de 55°C y una concentración de 1,5mM de Mg<sup>2+</sup>. En la primera columna de la tabla se indica el número de acceso de la secuencia correspondiente a cada subunidad a partir de la cual se diseñaron los oligonucleótidos. Al final de la secuencia nucleotídica de cada cebador se muestra, entre paréntesis, la localización del nucleótido inicial del cebador (extremo 5') en la secuencia a la que hace referencia la tabla. Como control interno, en todos los experimentos se realizó la amplificación de la enzima Dopamina β-Hidroxilasa (DBH), característica de las células cromafines.

Posteriormente, se llevó a cabo una segunda PCR utilizando alícuotas de 2 µl de los productos amplificados durante la primera ronda de PCR. En esta segunda fase, el ADNc de cada subunidad nicotínica era amplificado de forma independiente en cada alícuota, utilizando la pareja específica de cebadores. Los productos amplificados durante esta segunda PCR, se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, utilizando el marcador de peso molecular de 100pb y bromuro de etidio para su visualización. La identificación de cada producto amplificado se realizó de acuerdo a su tamaño y tras su secuenciación. Simultáneamente se realizaban controles negativos utilizando el aspirado de solución extracelular sobre el que se realizaba la RT-PCR.

**Tabla 3.6.** Pareja de cebadores utilizados en las reacciones de PCR en célula única

<b>Subunidad</b>	<b>Oligonucleótidos célula única</b>	<b>Tamaño de banda (pb)</b>
<b>α<sub>3</sub></b> <b>NM_052805</b>	Sentido: 5'- GGA AAC CCT CTG ACT ACC AA (425) Antisentido: 5'- CTT GAG GTT CAT GGA GGA GC (729)	304
<b>α<sub>7</sub></b> <b>NM_012832</b>	Sentido: 5'-GCC ACG TTC CAC ACC AAT G (392) Antisentido: 5'-GTC CTA CGG CGC ATG GTT A (712)	320
<b>α<sub>9</sub></b> <b>NM_022930</b>	Sentido: 5'-CGT CCT CAT ATC GTT CCT CG TCC G (831) Antisentido: 5'- TGG TAA GGG CTG TGG AGG CAG TGA (1039)	208
<b>α<sub>10</sub></b> <b>NM_022639</b>	Sentido: 5'-GCA GCC TAC GTG TGC AAC CTC CTG C (772) Antisentido: 5'-AGG TGT CCC AGC AGG AGA ACC CGA G (1094)	322
<b>DBH</b> <b>NM_013158</b>	Sentido: 5'-CAC CAC ATC ATC ATG TAT GAG GC (745) Antisentido: 5'-CCT GGC GAG CAC AGT AAT CAC C (1293)	548

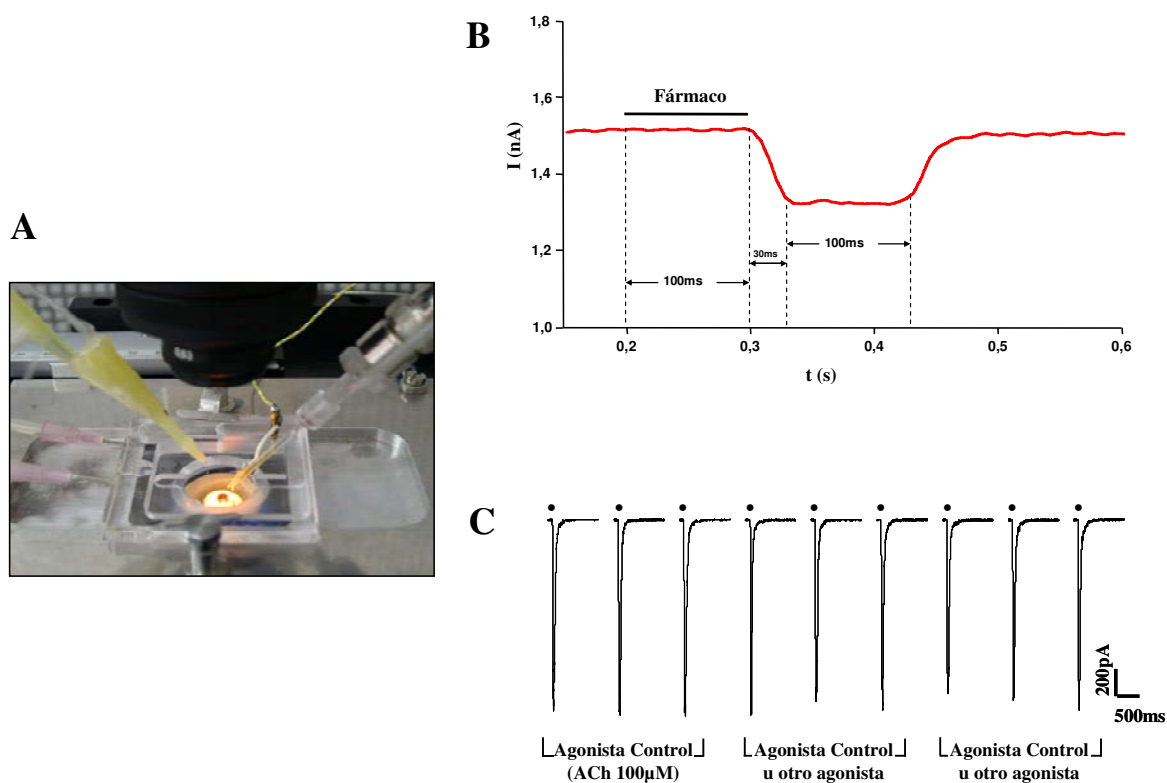
### ***3.2.6. Análisis estadístico***

Los resultados aparecen expresados como media $\pm$ error estándar de la media (ESM) para un determinado número (n) de experimentos. La comparación entre las medias correspondientes a distintos grupos de experimentos se realizó mediante el test de la *t* de Student para datos no pareados, considerándose significativas aquellas diferencias para las que *p* resultó ser menor de 0,05.



## **Capítulo IV: Resultados**

#### 4.1. Reproducibilidad de las corrientes inducidas por ACh en las células cromafines de la rata



**Figura 4.1.** Sistema de administración de fármacos y reproducibilidad de las corrientes inducidas por ACh. **A.** Dispositivo de aplicación local de fármacos. En el centro se muestra la cámara de perfusión sobre la que se deposita un cubreobjetos conteniendo las células cromafines. A la derecha aparece una micropipeta de vidrio conectada a un preamplificador de “patch-clamp”. A la izquierda se observa un haz de cinco tubos de polietileno, cada uno de ellos de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, empleado en la superfusión de fármacos y soluciones salinas. El extremo del mismo está formado por un único tubo al que acceden las distintas soluciones, y cuya punta se sitúa aproximadamente a 100  $\mu\text{m}$  de la célula en estudio. **B.** Características cinéticas del sistema de aplicación de fármacos. Se muestra la corriente que fluye a través de una micropipeta de “patch-clamp” rellena con una solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%) y bañada por una solución externa de idéntica composición cuando el  $V_h = 2\text{mV}$ . La administración local de un pulso de 100ms de una solución salina diluida (NaCl al 0,2%) determina una disminución de la corriente debida a la menor conductividad de la solución aplicada. El cambio de la corriente se produce con una latencia de 100ms respecto al comienzo de la aplicación y tarda 30ms en completarse (tiempo de recambio). **C.** Respuestas de corriente inducidas por la aplicación de 9 pulsos de ACh (100  $\mu\text{M}$ ) de 100 ms a intervalos de 45 s (puntos negros sobre los registros de corriente); obsérvese la constancia en la magnitud de las corriente nicotínica obtenidas con este protocolo de estimulación. En la mayoría de los experimentos de este trabajo, los pulsos 4°, 5° y 6° corresponden a la administración de distintas concentraciones de ACh o de otro agonista; los efectos de los diversos antagonistas empleados también fueron evaluados durante esos mismos tres pulsos en coaplicación con el agonista. Los antagonistas fueron también superfundidos con la solución externa durante los 45s inmediatamente precedentes a los pulsos 4°, 5° y 6°.

Con la finalidad de minimizar la desensibilización de los receptores se empleó un sistema de administración de fármacos, diseñado especialmente (**Fig. 4.1 A**), que permite realizar aplicaciones de los mismos durante tiempos muy cortos (**Fig. 4.1 B**), considerando que la estimulación repetida o prolongada de los nAChRs ocasiona su desensibilización, en la que intervendrían factores como el tipo de receptor, la concentración y el tipo de

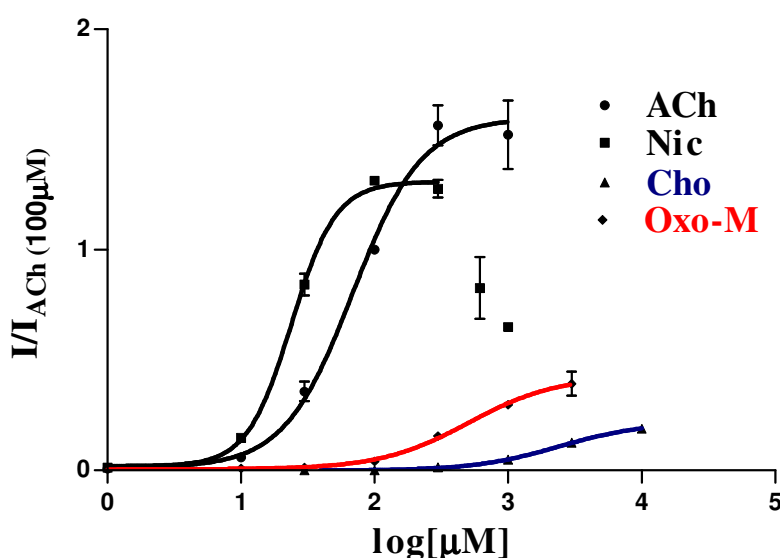
agonista, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y diversas proteínas cinasas y fosfatasa intracelulares<sup>(116,117)</sup>.

Como se muestra en la **Fig. 4.1 C**, la administración de pulsos de ACh (100  $\mu\text{M}$ ) de 100ms de duración a intervalos de 45s dio lugar a respuestas de corriente con magnitudes muy reproducibles. Este tipo de protocolos de administración han posibilitado la caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la rata al evitar que la desensibilización interfiriese en la valoración de los efectos de los fármacos.

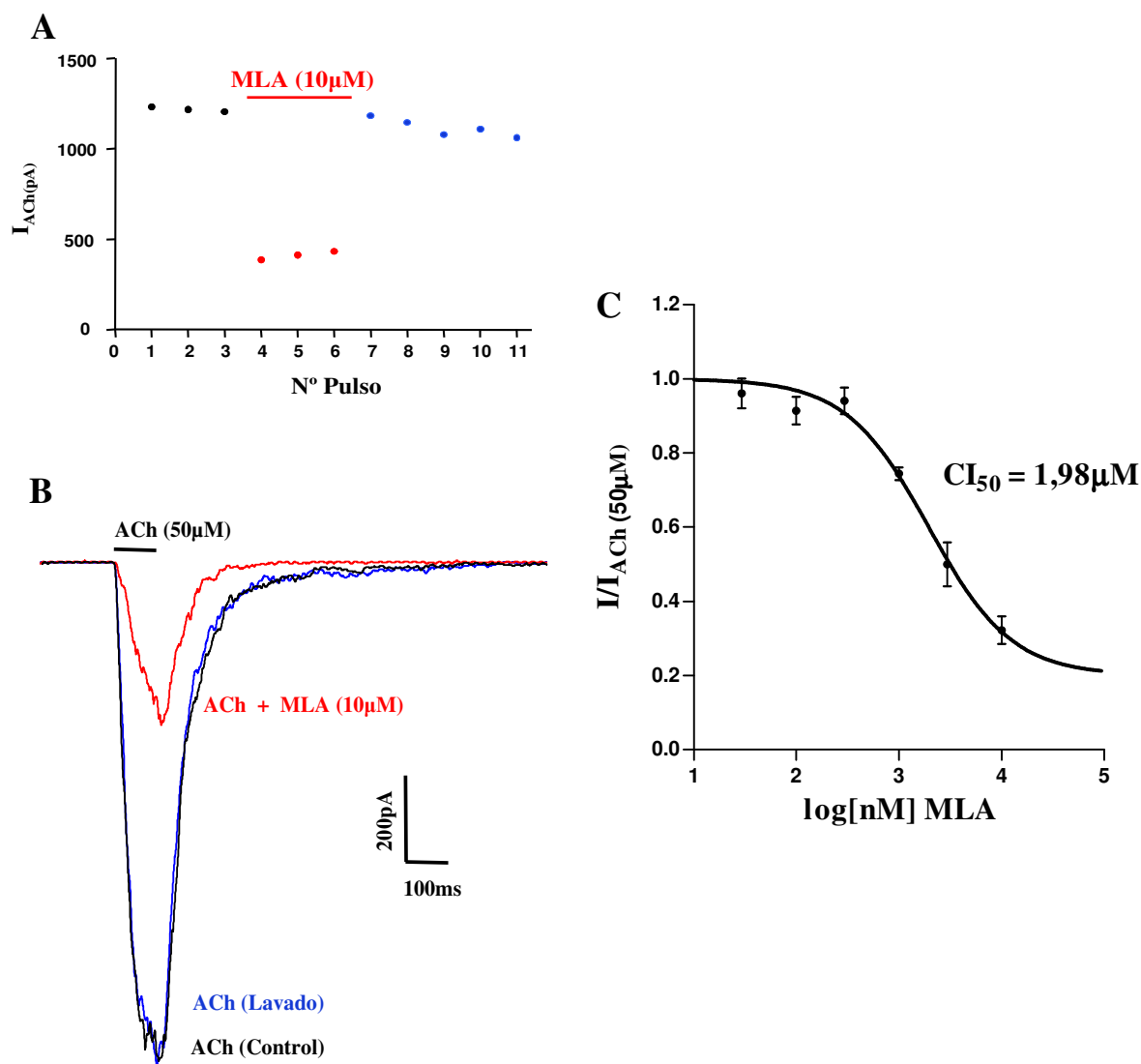
#### 4.2. Caracterización farmacológica de los receptores nicotínicos de la célula cromafín de la rata

La caracterización farmacológica de los nAChRs comenzó con la realización de curvas concentración-respuesta tanto para fármacos agonistas no selectivos de los nAChRs (Nic y ACh) como selectivos de los receptores  $\alpha_7$  (Cho) y  $\alpha_9\alpha_{10}$  (Cho y Oxo-M). Las respuestas obtenidas (pulsos 4º, 5º y 6º) fueron normalizadas respecto a las respuestas control inducidas por ACh 100  $\mu\text{M}$  (pulsos 1º, 2º y 3º), estimándose valores de  $\text{CE}_{50}$  de 63, 24, 507 y 2393  $\mu\text{M}$  para ACh, Nic, Oxo-M y Cho, respectivamente (**Fig. 4.2**). Estos resultados, además de poner de manifiesto la heterogeneidad de los receptores nicotínicos funcionales presentes en las células cromafínes de la rata, inducen a suponer la presencia, en dichas células, de los subtipos  $\alpha_7$  y/o  $\alpha_9\alpha_{10}$ .

**Figura 4.2.** Curvas concentración-respuesta para ACh, Nic, Oxo-M y Cho en células cromafínes de la rata ( $V_h = -70$  mV). Los valores representados son las medias de las corrientes normalizadas respecto a la corriente inducida por ACh (100  $\mu\text{M}$ ) en la misma célula ( $n=3-9$ ). Las barras verticales representan el ESM.

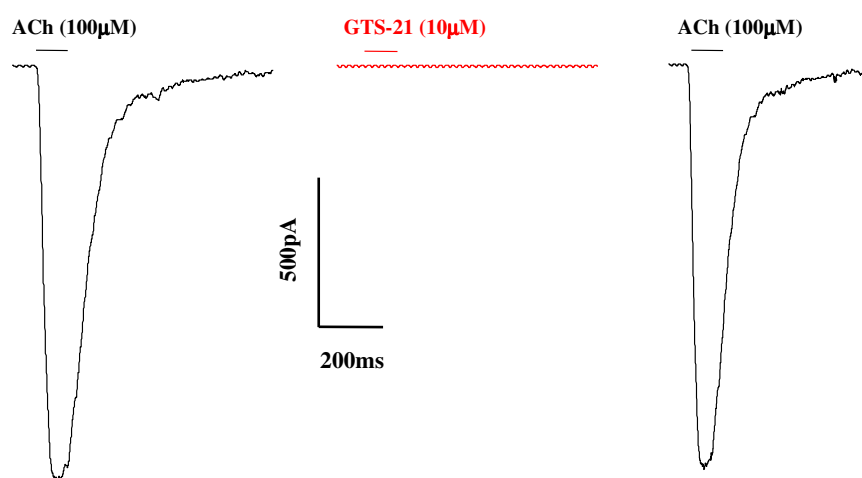


Esta heterogeneidad de receptores quedó confirmada mediante el empleo de MLA, un antagonista de los receptores  $\alpha_7$  y  $\alpha_9\alpha_{10}$ , a concentraciones inferiores a 300nM, y de los receptores  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ , a concentraciones superiores a la referida. La MLA produjo un bloqueo casi completo y reversible de las corrientes inducidas por ACh (50  $\mu$ M), con una  $CI_{50}$  de 1,98  $\mu$ M (Fig. 4.3).



**Figura 4.3.** Efecto de MLA sobre las corrientes inducidas por ACh (50  $\mu$ M) en las células cromafines de la rata. **A.** Curso temporal del efecto bloqueante de MLA (10  $\mu$ M). La ACh (50  $\mu$ M) fue administrada en pulsos de 100ms a intervalos de 45s. La MLA (10  $\mu$ M) fue continuamente superfundida entre los pulsos de 3° y 6° y coaplicada con ACh durante los pulsos 4° al 6°. **B.** Registros de corrientes representativas del bloqueo y reversión observados con MLA. **C.** Curva concentración-respuesta para MLA. Las respuestas fueron normalizadas respecto a la corriente inducida por ACh (50  $\mu$ M). Cada punto representa la media y las barras verticales el ESM de las respuestas obtenidas para cada concentración de antagonista en 4-7 células. Todos los experimentos se realizaron a un  $V_h$  de -70 mV.

Dado que no es posible diferenciar los receptores  $\alpha_7$  de los  $\alpha_9\alpha_{10}$  basándose sólo en el bloqueo producido por MLA a concentraciones menores de 300 nM o en las respuestas obtenidas con Cho, un agonista tanto de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  como de los  $\alpha_7^{(118)}$ , se decidió investigar el efecto del GTS-21, un agonista selectivo de los receptores  $\alpha_7$ . La administración de GTS-21, a la concentración que induce la activación máxima de los receptores  $\alpha_7$  en neuronas del hipocampo de rata, 10  $\mu\text{M}^{(119)}$ , indujo una respuesta de corriente sólo en el 12% de las células estudiadas (n=34), cuya magnitud fue inferior al 1% de la inducida por ACh 100  $\mu\text{M}$  (**Fig. 4.4; Tabla 4.1**).



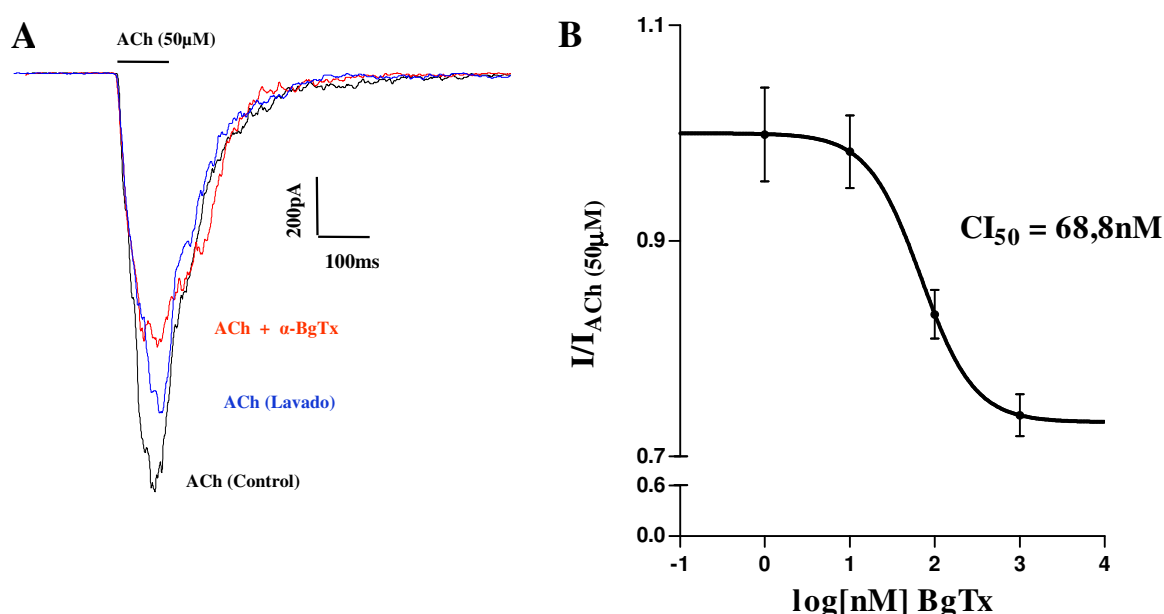
**Figura 4.4.** Efecto del GTS-21 sobre las células cromafines de la rata. Registro de las corrientes obtenidas tras la administración consecutiva de ACh (100  $\mu\text{M}$ ), GTS-21 (10  $\mu\text{M}$ ) y ACh (100  $\mu\text{M}$ ) a intervalos de 45s en la misma célula ( $V_h = -70$  mV).

**Tabla 4.1.** Corrientes inducidas por GTS-21 y ACh en las células cromafines de la rata.

Nº células (fracción y porcentaje de células que responden)	$I_{\text{ACh (100 } \mu\text{M})}$ (pA)	$I_{\text{GTS-21 (10 } \mu\text{M})}$ (pA)
30/34 (88%)	-896,07 $\pm$ 97,86	---
4/34 (12%)	-1622,09 $\pm$ 411,87	-10,78 $\pm$ 2,65

Resultados expresados como medias  $\pm$  ESM de las corriente registradas.

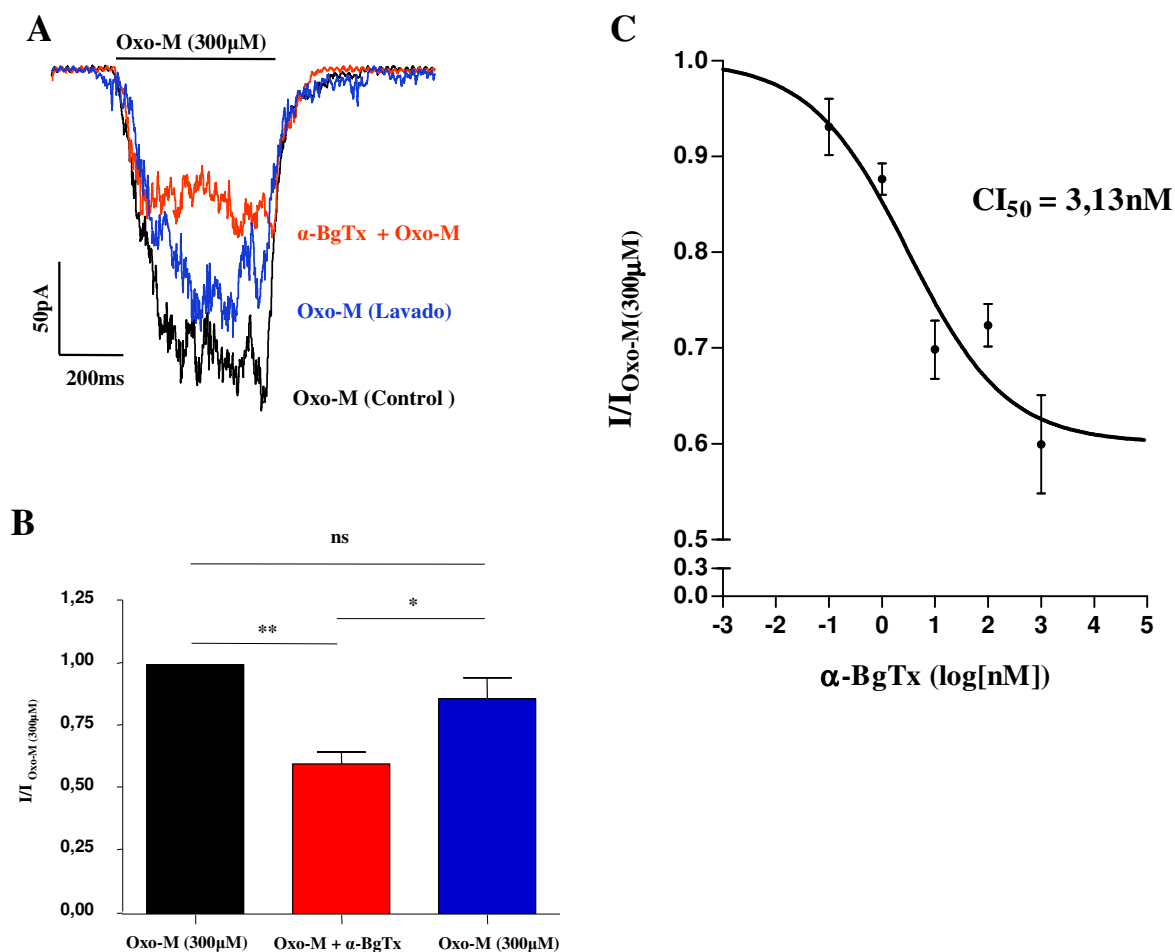
Con la finalidad de separar los componentes de la respuesta dependientes de la activación de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  y  $\alpha_7$ , también se recurrió a la  $\alpha$ -BgTx, un bloqueante reversible de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$ <sup>(91)</sup> e irreversible de los receptores  $\alpha_7$  homoméricos. Sobre las corrientes inducidas por ACh (50  $\mu$ M) dependientes de la activación del conjunto de los receptores nicotínicos de la célula cromafín de la rata, la  $\alpha$ -BgTx produjo una inhibición máxima del 30%, con una  $CI_{50}$  de 68,8 nM, siendo este efecto parcialmente reversible (**Fig. 4.5**).



**Fig. 4.5.** Efecto de  $\alpha$ -BgTx sobre las corrientes inducidas por ACh (50  $\mu$ M) en células cromafines de la rata. **A.** Registros representativos del efecto bloqueante de  $\alpha$ -BgTx (1  $\mu$ M) y de su reversibilidad. **B.** Curva de inhibición de ACh por  $\alpha$ -BgTx. Las respuestas fueron normalizadas respecto a la corriente inducida por ACh (50  $\mu$ M) en ausencia de  $\alpha$ -BgTx. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de los datos obtenidos en 5 a 6 células. ( $V_h = -70$  mV).

#### 4.3. Caracterización farmacológica del receptor nicotínico $\alpha_9\alpha_{10}$ de la célula cromafín de la rata

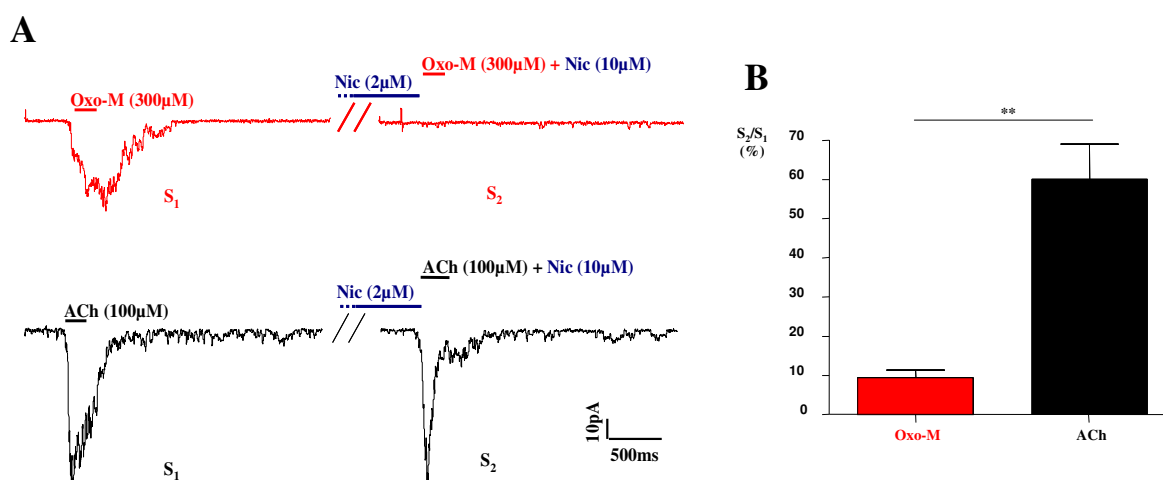
Con objeto de confirmar la presencia de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  en las células cromafines de la rata, se decidió evaluar el efecto de distintos antagonistas nicotínicos sobre las corrientes inducidas por la Oxo-M, así, la  $\alpha$ -BgTx produjo un bloqueo parcial ( $40 \pm 5,74\%$ ) y con una  $CI_{50}$  de 3,13 nM de la corriente activada por Oxo-M (300  $\mu$ M), siendo su efecto completamente reversible ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ) (**Fig. 4.6**).



**Figura 4.6.** Efecto de  $\alpha$ -BgTx sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M) en células cromafines de la rata. **A.** Registros de corrientes representativos del efecto bloqueante de  $\alpha$ -BgTx (1  $\mu$ M) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M) y de su reversibilidad. La Oxo-M fue aplicada o coaplicada con  $\alpha$ -BgTx durante 500 ms (barra horizontal encima de los registros). **B.** Reversibilidad del efecto bloqueante de  $\alpha$ -BgTx (1  $\mu$ M) sobre las respuestas inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M). **C.** Curva concentración-respuesta de Oxo-M en presencia de  $\alpha$ -BgTx. En B y C las respuestas fueron normalizadas respecto a la corriente inducida por Oxo-M (300  $\mu$ M) en ausencia de  $\alpha$ -BgTx; cada punto representa la media  $\pm$  ESM de los valores obtenidos en 5 a 6 células, los asteriscos indican la significación estadística: \*\*,  $P < 0,01$ ; \*,  $P < 0,05$  y ns, no significativo. El  $V_h$  en todos los experimentos es -70mV.

Se ha descrito que la Nic, el agonista clásico de los receptores nicotínicos, paradójicamente actúa como bloqueante de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$ . Para evaluar el posible efecto bloqueante de la Nic sobre estos receptores, se expusieron las células durante 5 segundos a una solución de Nic (2  $\mu$ M) con objeto de desensibilizar la respuesta dependiente de la activación de los receptores no  $\alpha_9\alpha_{10}$  y, en consecuencia, poder valorar los efectos de una aplicación posterior de Nic (10  $\mu$ M) sobre la corriente inducida por Oxo-M (300  $\mu$ M) o ACh (100  $\mu$ M).

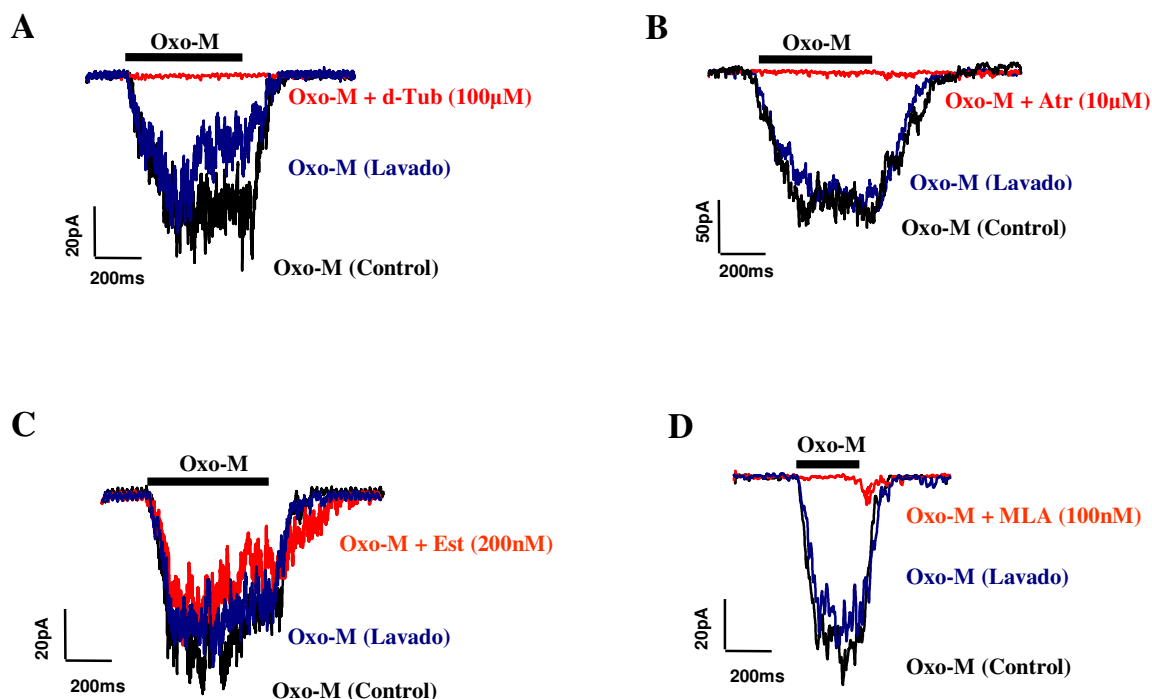
Como se muestra en la **Fig. 4.7**, la administración de Nic (10  $\mu$ M) inhibió en un  $90,57 \pm 7,85\%$  (n=5) la respuesta inducida por Oxo-M y en un  $41,49 \pm 13,44\%$  (n=6) de la respuesta inducida por la ACh.



**Figura 4.7.** Efecto de la Nic sobre los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  de las células cromafines de la rata. **A.** Registros representativos del efecto de la Nic (10  $\mu$ M) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M) (panel superior) y ACh (100  $\mu$ M) (panel inferior) en células previamente expuestas a Nic (2  $\mu$ M) durante 5s con objeto de desensibilizar los receptores no  $\alpha_9\alpha_{10}$ . ( $V_h = -70$  mV). **B.** Efecto de la Nic (10  $\mu$ M) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M) o ACh (100  $\mu$ M). Los datos se obtuvieron en experimentos similares al mostrado en A y se expresan como la razón de la respuesta alcanzada en presencia de Nic (10  $\mu$ M) (S<sub>2</sub>) y la respuesta obtenida 45s antes en condiciones control (S<sub>1</sub>). Los valores representados corresponden a la media  $\pm$ ESM de 5 células para cada agonista. ( $V_h = -70$  mV). \*\*,  $p < 0,01$ .

Para reforzar la evidencia favorable a la presencia de receptores nicotínicos  $\alpha_9\alpha_{10}$  se estudió el efecto de diferentes fármacos bloqueadores de estos receptores (d-Tub, Atr, Est y MLA) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M) (**Fig. 4.8**). Mientras que la abolición de las corrientes por d-Tub (100  $\mu$ M, n = 4) confirma la naturaleza nicotínica de las respuestas inducidas por Oxo-M, los efectos inhibidores observados tras la administración de Atr (10  $\mu$ M; 100%, n = 5), Est (200 nM;  $54,53 \pm 0,054\%$ ) y MLA (100 nM;  $82,32 \pm 3,27\%$ ; n = 6), son congruentes con el perfil farmacológico de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  tanto nativos (células ciliadas internas de la rata) como recombinantes.



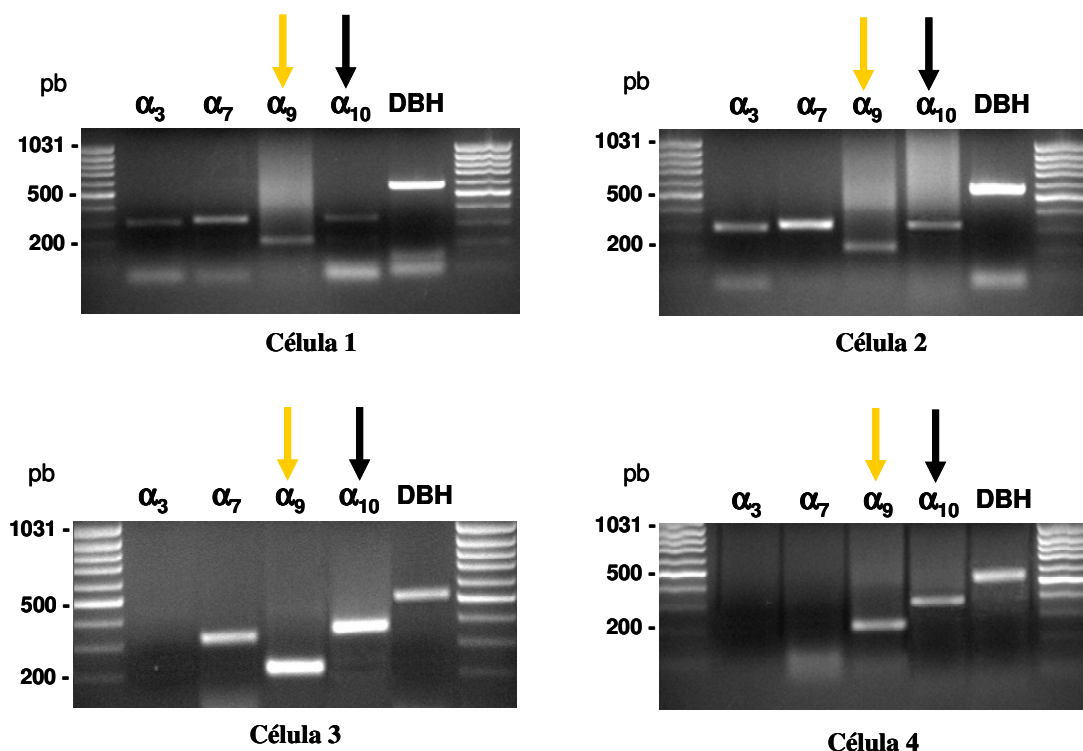


**Figura 4.8.** Efecto de diversos antagonistas de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  sobre las corrientes inducidas por Oxo-M. Se muestran registros representativos del efecto de d-Tub (100  $\mu$ M; **A**), Atr (10  $\mu$ M; **B**), Est (200 nM; **C**) y MLA (100 nM; **D**); sobre las corrientes inducidas por pulsos de Oxo-M (300  $\mu$ M). Todos los experimentos se realizaron a un  $V_h = -70$  mV;  $n = 4-6$ .

#### 4.4. Identificación de los receptores $\alpha_9\alpha_{10}$ mediante RT-PCR de las subunidades $\alpha_9\alpha_{10}$ en las células cromafines de la rata

Una vez establecida farmacológicamente la presencia de receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  funcionales, se procedió a realizar la identificación de los mismos mediante técnicas de biología molecular. En concreto, recurrimos a la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en célula única para amplificar el ARNm de las subunidades constituyentes de los receptores nicotínicos presentes en las células cromafines de la rata. Al objeto de intentar establecer una correlación entre los resultados funcionales y moleculares se utilizaron las mismas células para los registros electrofisiológicos y para la extracción del ARNm. Así, tras realizar el registro de las corrientes se aspiró el contenido citoplásmico evitando arrastrar el núcleo celular. La amplificación se realizó en dos etapas, la primera de ellas simultáneamente con la transcripción reversa y con las parejas de cebadores (sentido y antisentido) de las subunidades nicotínicas neuronales  $\alpha_3$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$ . La segunda etapa es propia de cada ADNc que es amplificado, y en ella se emplea sólo la correspondiente pareja específica de cebadores<sup>(120)</sup>. La identificación de cada producto se

realizó mediante electroforesis y subsiguiente “Southern-blot”. Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados a partir de secuencias conocidas de las distintas subunidades de la rata y, cuando esto no fue posible, a partir de secuencias conservadas en diferentes especies animales utilizando el programa Oligo 4.0<sup>(121)</sup>. En las células analizadas, se amplificó también de forma paralela, el mRNA que codifica para la enzima de la ruta biosintética de las catecolaminas DBH, propia de las células cromafines.

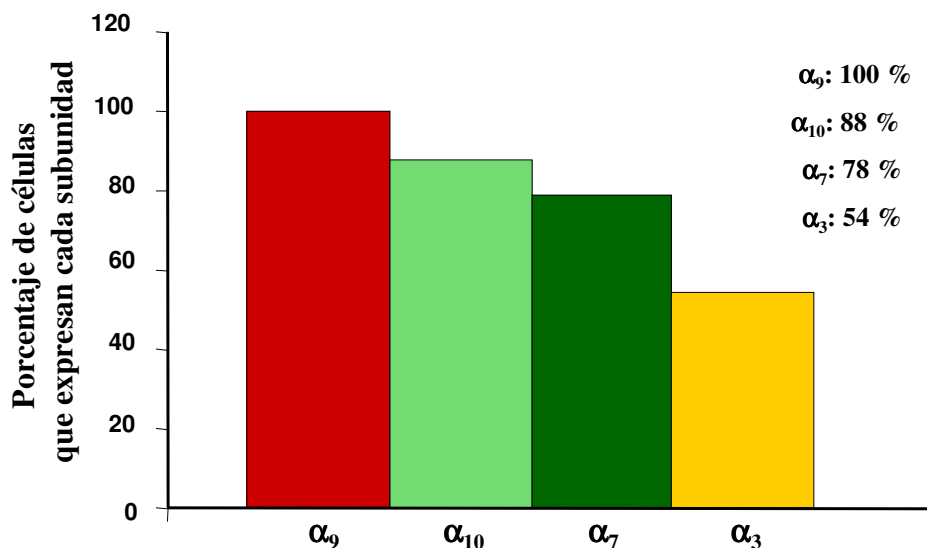


**Figura 4.9.** Separación por electroforesis en gel de azarosa de los productos correspondientes a distintas subunidades nicotínicas expresadas por 4 células cromafines. La amplificación fue obtenida a partir del citoplasma de cada célula, utilizando la técnica de RT-PCR en célula única. Obsérvese la presencia de fragmentos de dimensiones (en pares de bases) correspondientes a las de las subunidades indicadas en la parte superior de la figura.

La **Fig. 4.9** muestra los resultados obtenidos en 4 células cromafines de rata pertenecientes a un mismo cultivo. Se puede apreciar una gran heterogeneidad en lo que concierne a la expresión de las subunidades nicotínicas ensayadas. Así, mientras las células 1 y 2 expresan las 4 subunidades ensayadas, la célula 3 no expresa la subunidad  $\alpha_3$  y la célula 4 sólo expresa las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$ .

Cuando se analizaron los datos obtenidos en distintas células, pertenecientes a 8 cultivos distintos, se comprobó que todas ellas expresaban la subunidad  $\alpha_9$ , mientras que la

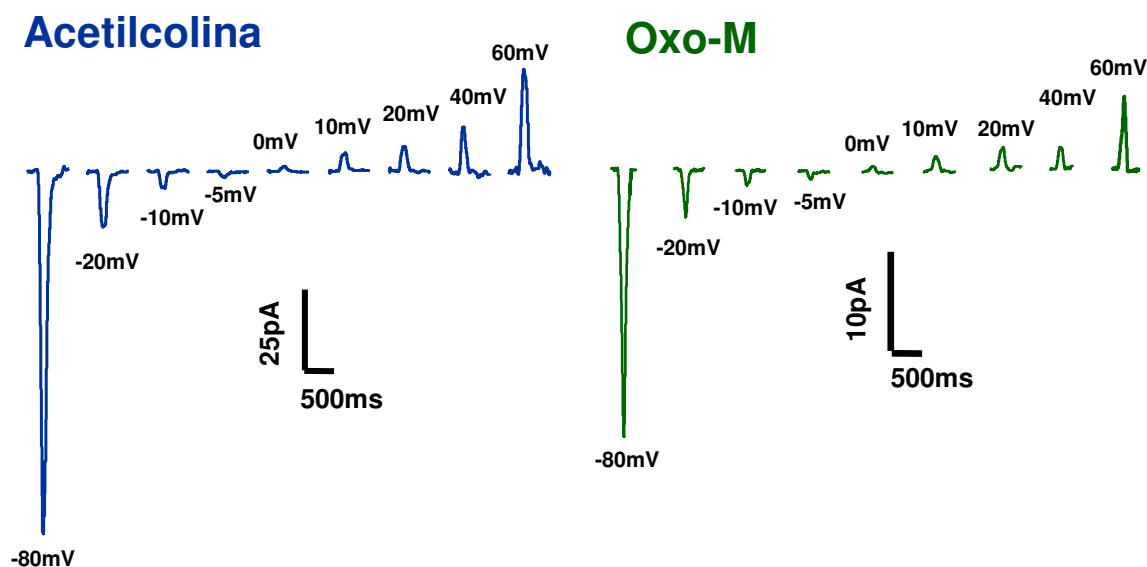
subunidad más errática en relación a su expresión era la  $\alpha_3$ , que sólo aparece en la mitad de las células analizadas (**Fig. 4.10**).



**Figura 4.10.** Porcentajes de células cromafines que expresan cada subunidad nicotínica. El 100% de las células analizadas expresan el mRNA que codifica para la subunidad  $\alpha_9$ . Se analizaron un total de 52 células.

#### 4.5. Estudio de la selectividad iónica de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la rata

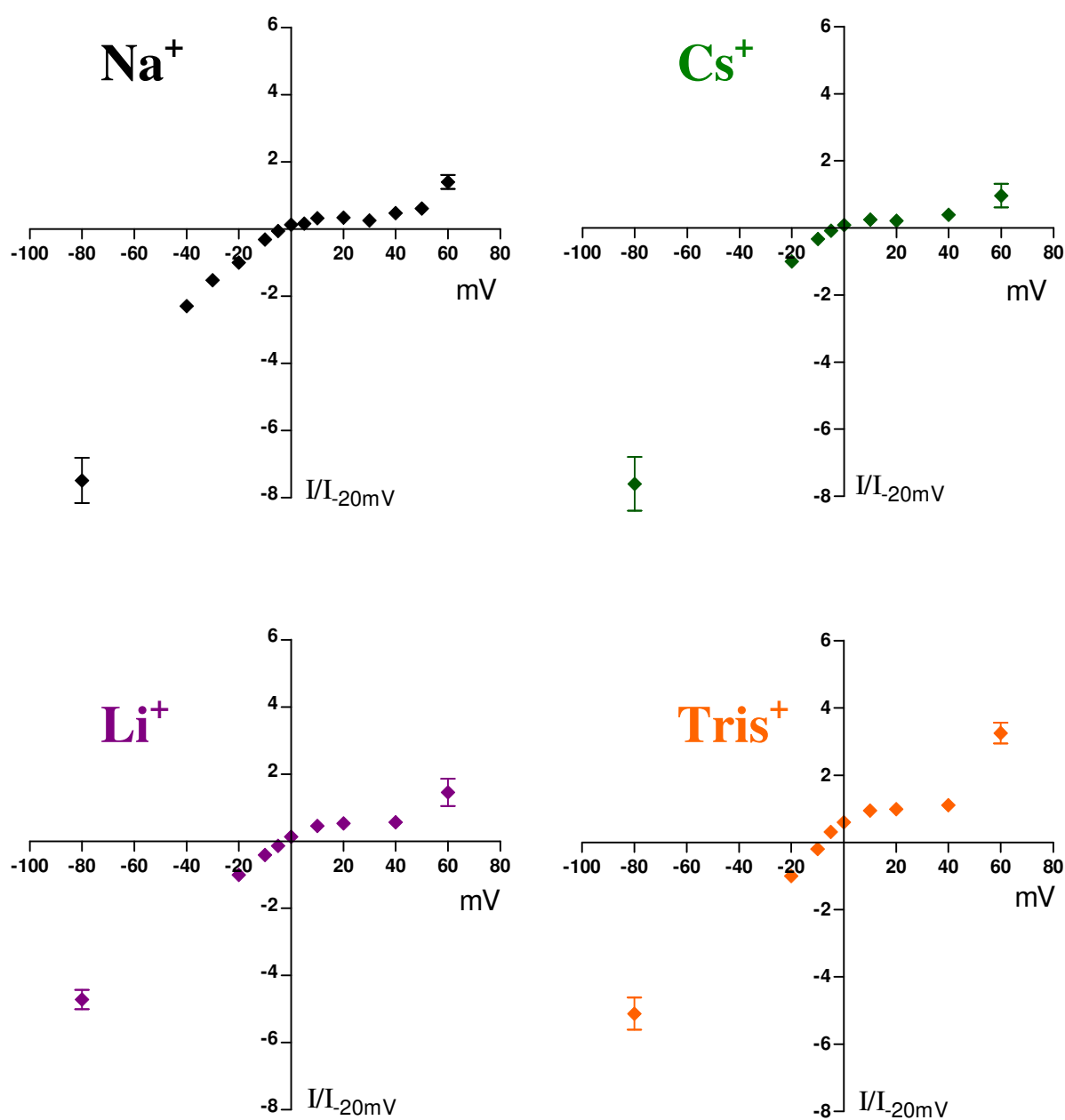
El estudio de la selectividad iónica de los nAChRs se basó en la medida del potencial de reversión ( $E_{rev}$ ) de las corrientes inducidas por ACh (100  $\mu$ M), que activa el conjunto de los nAChRs de la célula cromafin, o por Oxo-M (300  $\mu$ M) que activa preferentemente los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$ . Para determinar el  $E_{rev}$ , se construyeron, bajo diferentes condiciones iónicas (**Tabla 4.2**), las correspondientes curvas I/V en estado estacionario (con modificación del potencial de fijación,  $V_h$ , durante períodos de 45s). En cada célula se evaluaron las respuestas a un único fármaco agonista en al menos cuatro potenciales diferentes, que se escogieron de forma aleatoria en el rango comprendido entre los valores de -80 y +60 mV (**Fig. 4.11**). Para facilitar la comparación de los resultados obtenidos en las diferentes células, la corriente máxima durante cada aplicación fue normalizada respecto a la obtenida a -80mV (solución extracelular conteniendo 10 mM de  $Ca^{2+}$ ) ó a -20 mV (soluciones extracelulares conteniendo 1 mM de  $Ca^{2+}$ ) (**Fig. 4.12 y 4.13**).



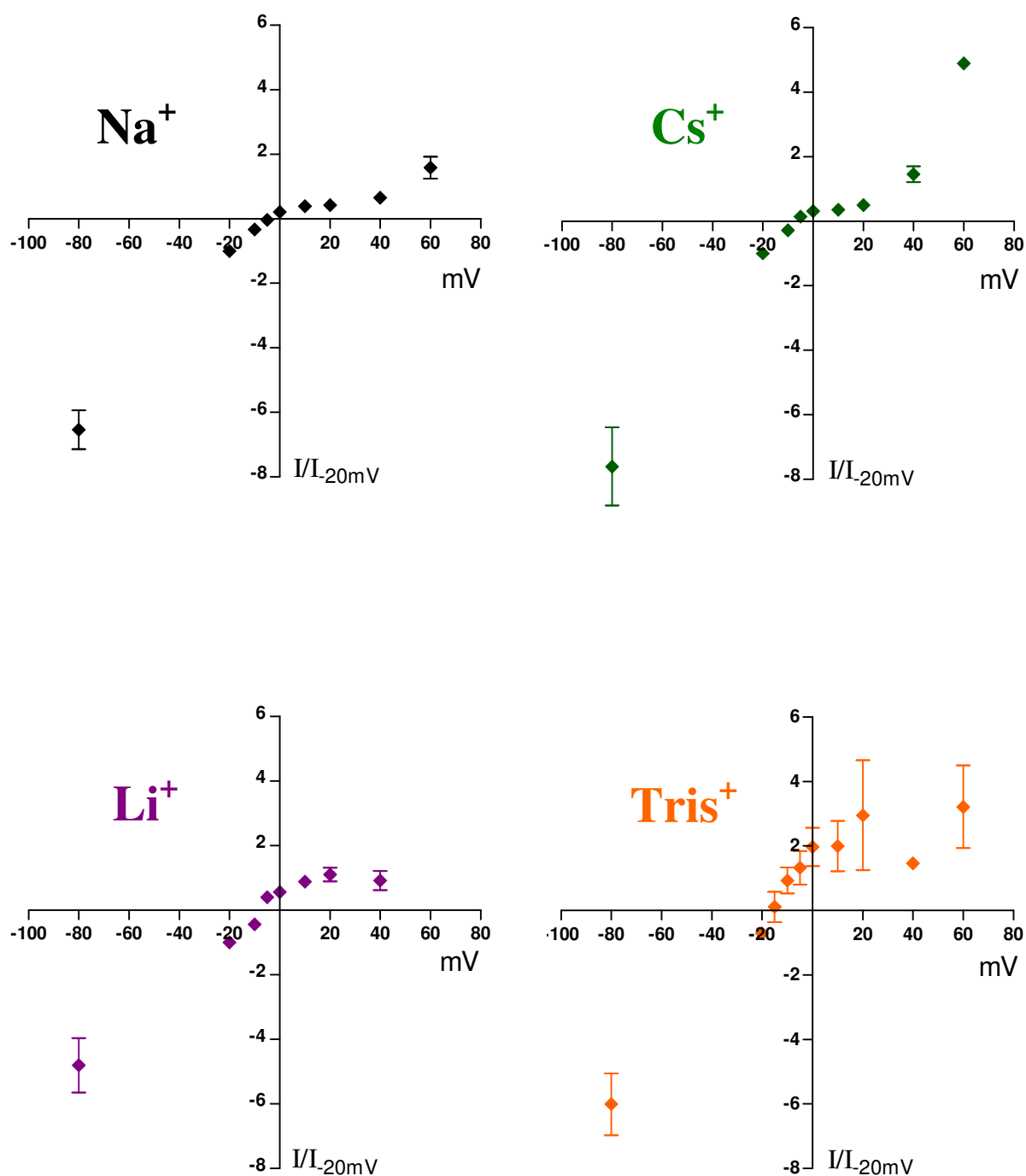
**Figura 4.11.** Corrientes inducidas por ACh (100  $\mu$ M) y Oxo-M (300  $\mu$ M) a diferentes potenciales de fijación, desde -80 hasta +60 mV. Se muestran las respuestas obtenidas en células dializadas con 142 mM NaCl y superfundidas con una solución con 140 mM de NaCl.

	S. Externa (mM)	S. Interna (mM)
NaCl	140/59/10/99	141
XCl	0/81/130/41	1/1/1/1
CaCl <sub>2</sub>	1	0,001
MgCl <sub>2</sub>	2	--
HEPES	10	10
EGTA	--	10
ATP.Na <sub>2</sub>	--	2
GTP.Li <sub>2</sub>	--	0,3
Sacarosa	20	--
XCl=NaCl / CsCl / LiCl / TrisCl		

**Tabla 4.2.** Composición de las soluciones utilizadas para el estudio de la permeabilidad iónica de los nAChRs de las células cromafines de la rata. En la solución externa, el NaCl (negro) fue parcialmente reemplazado isoosmóticamente por cloruro de Cs<sup>+</sup> (verde), Li<sup>+</sup> (morado) o tris<sup>+</sup> (amarillo), mientras que en la solución interna se sustituyó 1 mM de NaCl (NaCl total de 142 mM) por 1 mM de la sal del ión correspondiente.



**Figura 4.12.** Curvas I/V de las corrientes inducidas por ACh (100  $\mu$ M), que activa el conjunto de nAChRs de la célula cromafín, a distintos potenciales de fijación (rango desde -80 hasta +60 mV) en células expuestas a los diferentes pares de soluciones (externa e interna) consignadas en la **Tabla 4.2**. Na<sup>+</sup> (negro), Cs<sup>+</sup> (verde), Li<sup>+</sup> (morado) y tris<sup>+</sup> (amarillo). Los diamantes representan las medias  $\pm$  ESM ( $n=5-9$ ) de las corrientes máximas normalizadas respecto a la corriente obtenida en la misma célula a -20 mV. Los valores de potencial no han sido corregidos en función de los potenciales de difusión ( $V_{PD}$ ).



**Figura 4.13.** Curvas I/V de las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M) a distintos potenciales de fijación (rango desde -80 hasta +60 mV) en células expuestas a los diferentes pares de soluciones (externa e interna) consignadas en la **Tabla 4.2**. Na<sup>+</sup> (negro), Cs<sup>+</sup> (verde), Li<sup>+</sup> (morado) y tris<sup>+</sup> (amarillo). Los diamantes representan las medias  $\pm$  ESM ( $n=5-9$ ) de las corrientes máximas en cada aplicación normalizadas respecto a la obtenida en la misma célula a -20 mV. Los valores de potencial no han sido corregidos en función de los potenciales de difusión ( $V_{PD}$ ).

Las curvas I/V una marcada rectificación de entrada y linealidad a potenciales negativos a -10 mV. Es de destacar también una región de pequeña conductancia de reversión, entre el potencial de reversión y +40 mV.

Una vez determinado el  $E_{rev}$  a partir de las curvas I/V, la posterior aplicación de ecuación de GHK para voltaje, posibilitó el cálculo para el nAChR  $\alpha_9\alpha_{10}$  de unas razones de permeabilidades para cationes monovalentes ( $Na^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Li^+$  y  $Tris^+$ ) (Tabla 4.4) que si bien no difirieron sustancialmente de las estimadas para el conjunto de nAChRs de las células cromafines de la rata (Tabla 4.3) dieron lugar a secuencias de permeabilidad ligeramente distintas:

Acetilcolina:  $Cs^+ > Li^+ \geq Na^+ \gg Tris^+$

Oxotremorina-M:  $Cs^+ > Na^+ \geq Li^+ \gg Tris^+$

$[X^+]_e$ (mM)	$Cs^+ / Na^+$ (81 / 59)	$Li^+ / Na^+$ (130 / 10)	$Na^+$ (140)	$Tris^+ / Na^+$ (41 / 99)
$E_{rev}$ (mV)	$1,95 \pm 0,20$ (n=7)	$-3,5 \pm 0,40$ (n=7)	$-1,74 \pm 0,16$ (n=9)	$-8,13 \pm 0,58$ (n=7)
$P_X/P_{Na}$	$1,52 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,02$	1	$0,45 \pm 0,08$

**Tabla 4.3.** Potenciales de reversión ( $E_{rev}$ ) y razones de permeabilidad ( $P_X/P_{Na}$ ) para distintos cationes monovalentes del conjunto de los nAChRs de la célula cromafín de la rata.

En la fila superior se muestran, con el código de colores habitual, las concentraciones de los cationes monovalentes existentes en las distintas soluciones externas. Los valores representan medias  $\pm$  ESM.

$[X^+]_e$ (mM)	$Cs^+ / Na^+$ (81 / 59)	$Na^+$ (140)	$Li^+ / Na^+$ (130 / 10)	$Tris^+ / Na^+$ (41 / 99)
$E_{rev}$ (mV)	$-1,88 \pm 1,76$ (n=10)	$-2,45 \pm 1,07$ (n=13)	$-8,19 \pm 0,17$ (n=6)	$-11,39 \pm 0,08$ (n=3)
$P_X/P_{Na}$	$1,23 \pm 1,3$	1	$0,91 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$

**Tabla 4.4.** Potenciales de reversión ( $E_{rev}$ ) y razones de permeabilidad ( $P_X/P_{Na}$ ) para distintos cationes monovalentes del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$  de la célula cromafín de la rata.

En la fila superior se muestran con el código de colores habitual, las concentraciones de los cationes monovalentes existentes en las distintas soluciones externas. Los valores representan medias  $\pm$  ESM.

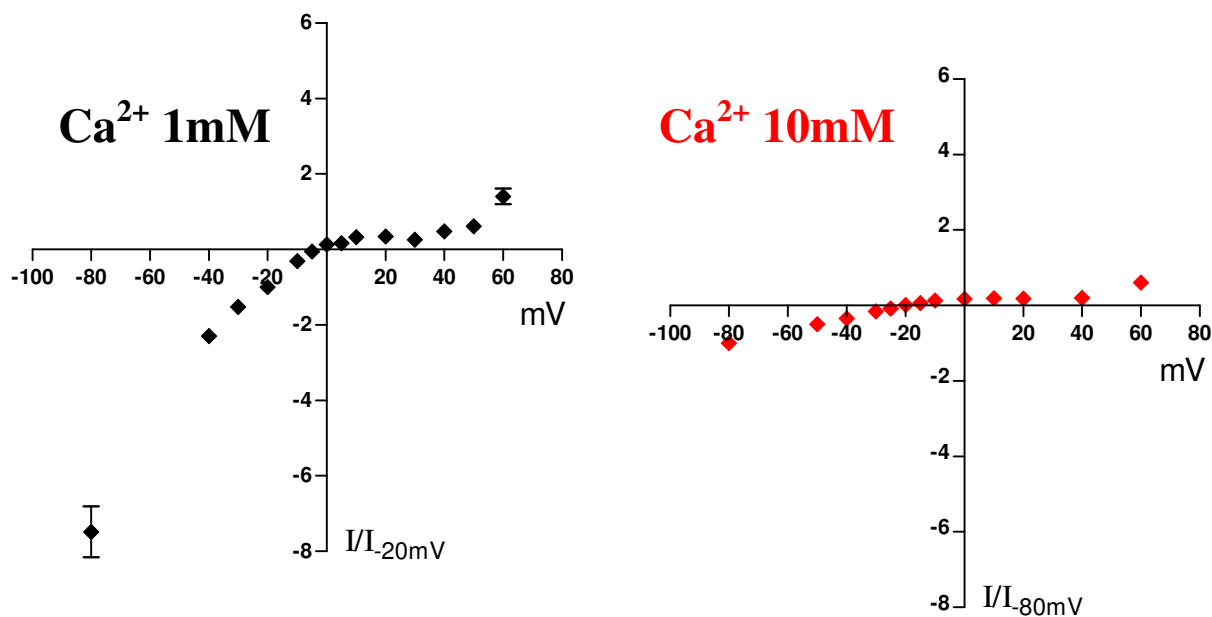
Asimismo, y dado que la permeabilidad de los nAChRs al  $Ca^{2+}$  les confiere una significación funcional particular, también determinó la permeabilidad relativa para este

catión. Tras la obtención de las curvas I/V para el conjunto de los nAChRs o los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  (**Fig. 4.14** y **Fig. 4.15**) en las condiciones iónicas indicadas en la **Tabla 4.5**, el cálculo de las razones de permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (**Tabla 4.6**) permite concluir que los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  presentan una mayor permeabilidad a este catión ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}=8,9$  en 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que el conjunto de los nAChRs de la célula cromafín de la rata ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}=3,3$  en 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Es de destacar también que el incremento de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 10mM se asoció a una marcada disminución de la conductancia de los nAChRs y de su permeabilidad relativa a dicho catión –aunque se mantiene la diferencia entre los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  y el conjunto de los nAChRs–, lo que sugiere que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  podrían interaccionar con el poro iónico de los nAChRs vulnerando el principio de independencia en la permeación a través de los canales iónicos.

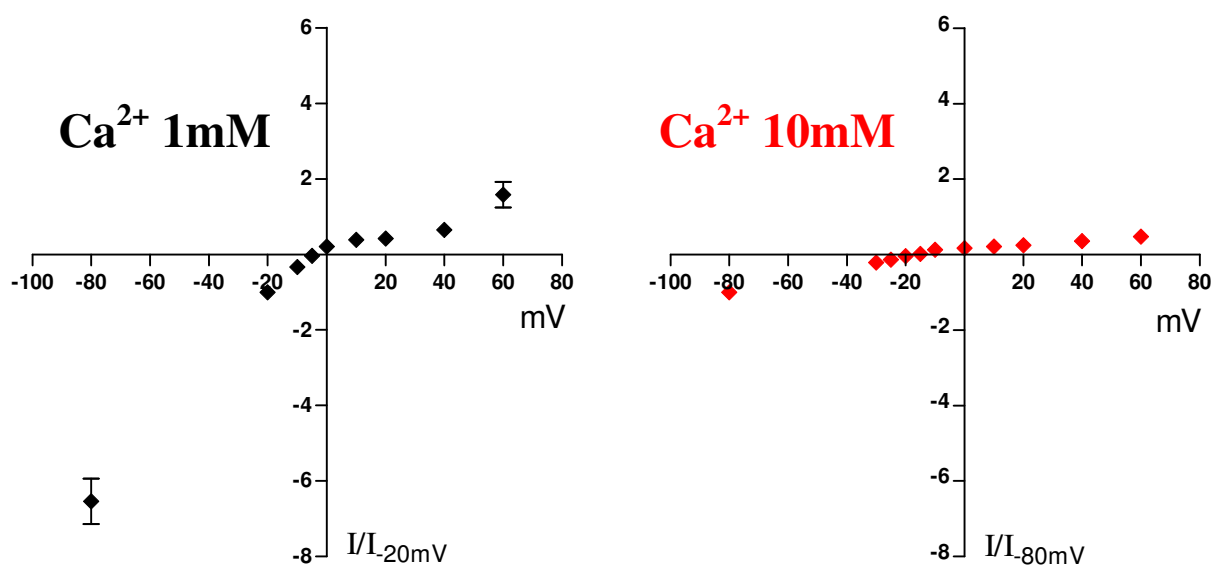
	S. Externa (mM)	S. Interna (mM)
<b>NaCl</b>	140 / 65,8	142
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1 / 10	0,1
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2	--
<b>HEPES</b>	10	10
<b>Sacarosa</b>	20 / 160	--
<b>EGTA</b>	--	1,1
<b>ATP.Na<sub>2</sub></b>	--	2
<b>GTP.Li<sub>2</sub></b>	--	0,3

**Tabla 4.5.** Composición de las soluciones utilizadas para el estudio de la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de los nAChRs. La composición iónica de las soluciones empleadas difirió en las concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 y 10 mM) y  $\text{Na}^+$  (140 ó 65,8 mM); la disminución de la osmolaridad motivada por la disminución de la concentración de  $\text{Na}^+$  fue compensada elevando el contenido de sacarosa.





**Figura 4.14.** Curvas I/V de las corrientes inducidas por ACh (100  $\mu$ M) en células cromafines de rata bañadas por una solución extracelular conteniendo 1 o 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (véase **Tabla 4.5**). Los diamantes representan las medias  $\pm$  ESM (n=5-9) de las corrientes normalizadas respecto a la obtenida en la misma célula a -20 mV (1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) o a -80 mV (10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ).



**Figura 4.15.** Curvas I/V de las corrientes inducidas por Oxo-M (300  $\mu$ M) en células cromafines de rata bañadas por una solución extracelular conteniendo 1 o 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (véase **Tabla 4.5**). Los diamantes representan las medias  $\pm$  ESM (n=5-9) de las corrientes normalizadas respecto a la obtenida en la misma célula a -20 mV (1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) o a -80 mV (10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

	nAChRs		$\alpha_9\alpha_{10}$	
[X <sup>+</sup> ] <sub>e</sub> (mM)	Ca <sup>2+</sup> / Na <sup>+</sup> (1 / 140)	Ca <sup>2+</sup> / Na <sup>+</sup> (10 / 65,8)	Ca <sup>2+</sup> / Na <sup>+</sup> (1 / 140)	Ca <sup>2+</sup> / Na <sup>+</sup> (10 / 65,8)
E <sub>rev</sub> (mV)	-1,74±0,16 (n=9)	-14,72±0,96 (n=7)	-2,45±1,07 (n=13)	-11,69±1,07 (n=7)
P <sub>X</sub> /P <sub>Na</sub>	<b>3,32±0,38</b>	<b>2,17±0,36</b>	<b>8,9±3,4</b>	<b>3,44±0,64</b>

**Tabla 4.6.** Potenciales de reversión (E<sub>rev</sub>) y razones de permeabilidad para el Ca<sup>2+</sup> (P<sub>Ca</sub>/P<sub>Na</sub>; 1 y 10mM de Ca<sup>2+</sup> extracelular) del conjunto de los nAChRs y del receptor  $\alpha_9\alpha_{10}$  de las células cromafines de la rata.

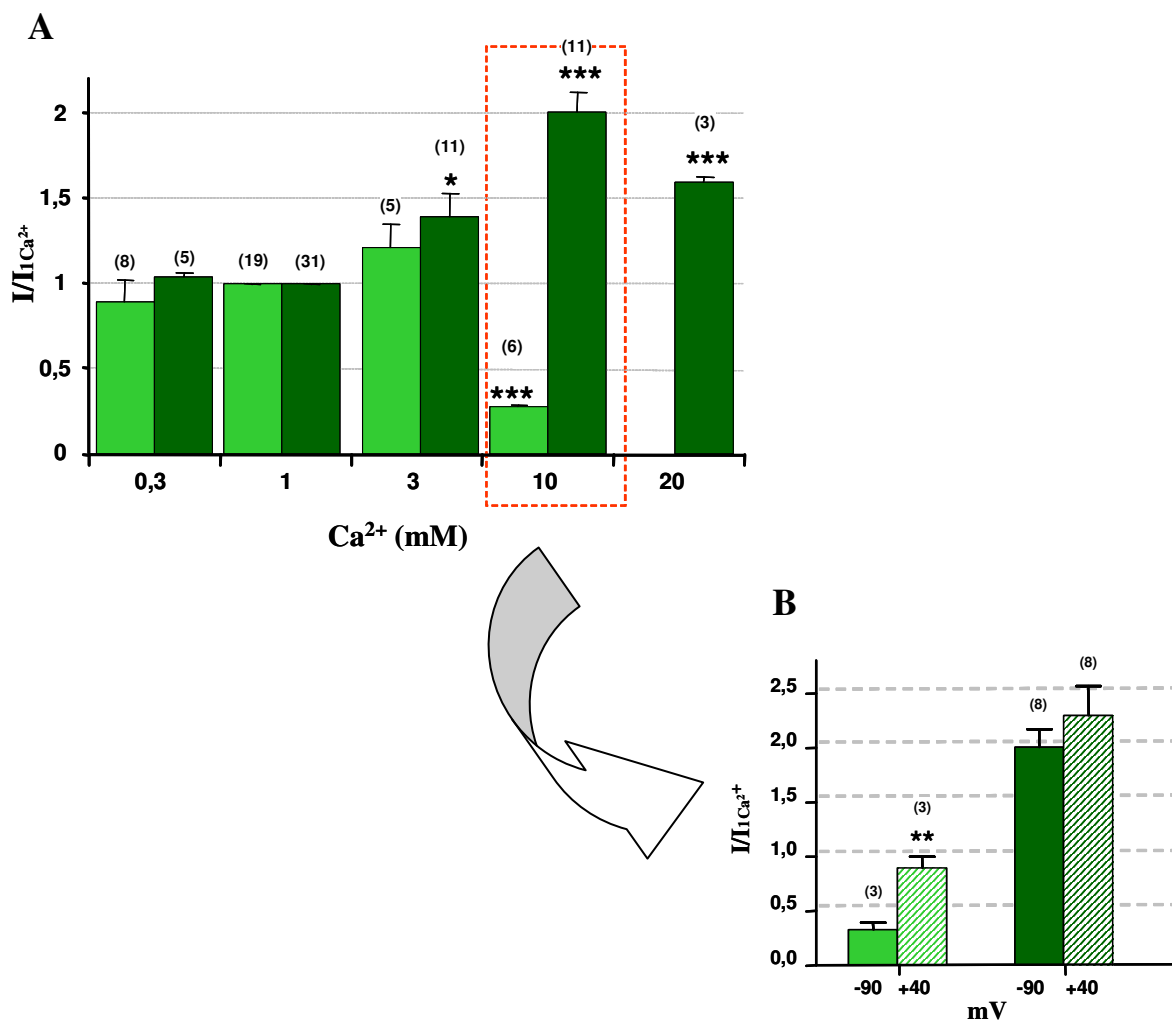
Se muestran los datos obtenidos con las soluciones consignadas en la **Tabla 4.5**. Los resultados son expresados como media±ESM.

#### 4.6. Modulación de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la rata por Ca<sup>2+</sup> extracelular

La marcada reducción de la conductancia de los nAChRs cuando se incrementa la concentración extracelular de Ca<sup>2+</sup>, que se acaba de referir, motivó la realización de un estudio sobre el efecto modulador de dicho catión sobre las corrientes nicotínicas. Para ello, se evaluó el efecto de una serie de concentraciones de Ca<sup>2+</sup> extracelular (0,3; 1; 3; 10 y 20mM) sobre las corrientes nicotínicas dependientes de la activación (mediante la administración de ACh) del conjunto de los nAChRs, o preferentemente de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  cuando se administra Oxo-M. Con la finalidad de poder comparar los efectos producidos por las distintas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y dado que en cada célula sólo se evaluaron los efectos de dos concentraciones de Ca<sup>2+</sup> extracelular, las amplitudes de las corrientes se normalizaron respecto a la obtenida en 1 mM, que fue la concentración empleada en la totalidad de las células analizadas.

Las células cromafines de la rata presentaron dos patrones de respuesta diferentes al ser estimuladas con Oxo-M a un potencial de fijación de -90 mV (**Fig. 4.16 A**). Así, en aproximadamente el 50% de las células estudiadas la corriente inducida por Oxo-M se incrementó al elevar el Ca<sup>2+</sup> extracelular en el rango de concentraciones comprendido entre 1 y 20 mM. En el resto de las células se observó un efecto dual del Ca<sup>2+</sup> extracelular, consistente en una ligera potenciación de la corriente nicotínica a la concentración de 3mM y en una marcada inhibición a la de 10mM. Para el conjunto de las células estudiadas, la reducción de la concentración extracelular de Ca<sup>2+</sup> hasta 0,3 mM no produjo un cambio significativo en la magnitud de las corrientes. Conviene señalar que la potenciación

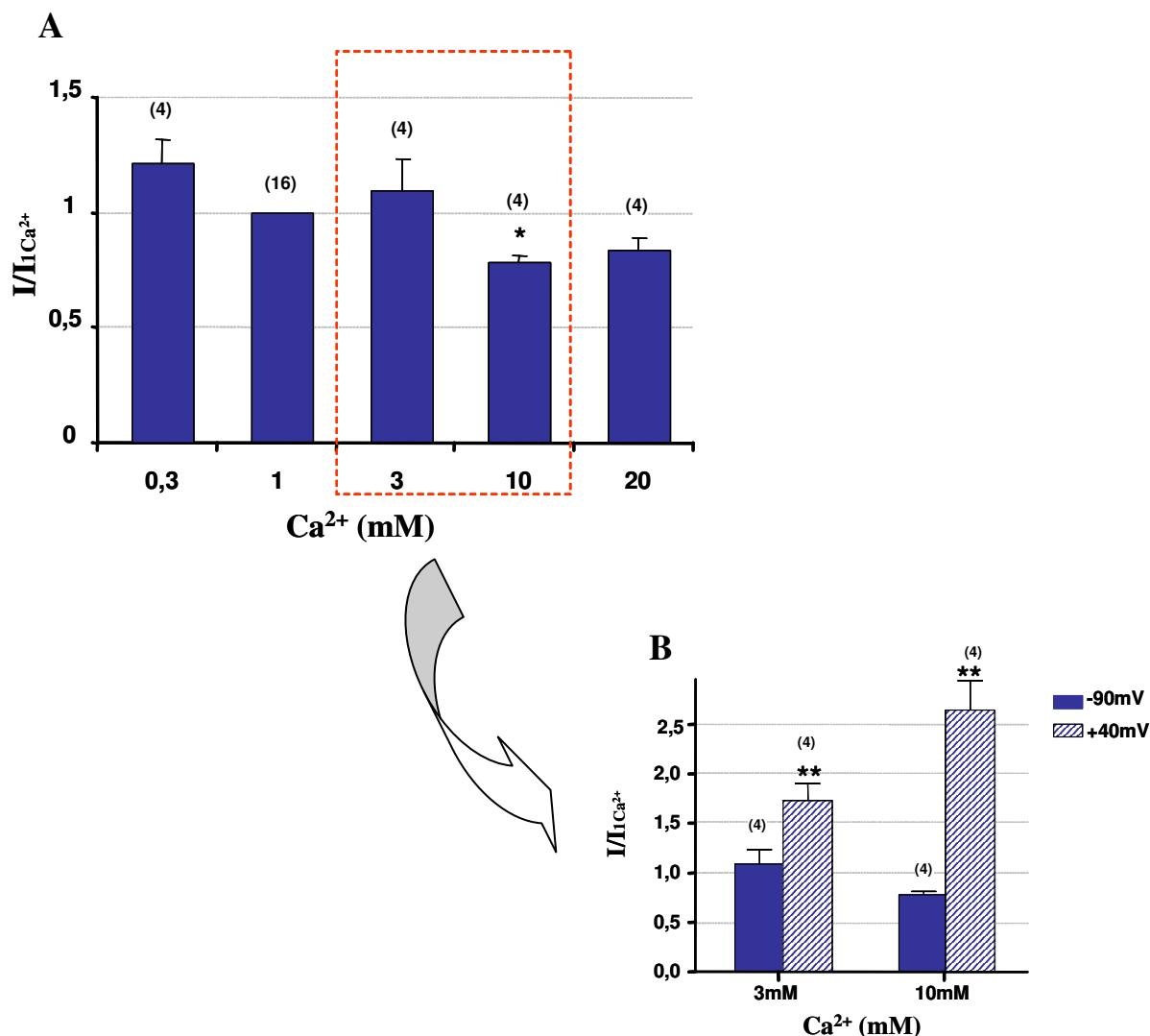
producida por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM) no manifestó dependencia de voltaje, ya que se observó tanto a un potencial de fijación de -90 como al de +40mV. Por el contrario, el efecto inhibitor registrado en otras células a la concentración de 10mM de  $\text{Ca}^{2+}$  sí fue dependiente de voltaje, desapareciendo al potencial de +40 mV (**Fig. 4.16 B**).



**Figura 4.16.** Modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de las corrientes inducidas por Oxo-M. Las células fueron superfundidas durante 1min con soluciones conteniendo distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,3; 1; 3; 10 y 20 mM) antes de ser estimuladas con Oxo-M (300  $\mu\text{M}$ ) en presencia de la correspondiente concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . **A.** Patrones de respuesta observados al modificar la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en células con el potencial fijado a -90 mV. En verde claro se muestran las respuestas de las células en las que se observa un efecto bloqueante del  $\text{Ca}^{2+}$  a la concentración de 10 mM, mientras que las células en las que predominó el efecto potenciador aparecen representadas en verde oscuro. **B.** Efecto del voltaje sobre el efecto modulador de la concentración 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. El potencial de membrana de las células se fijó a -90 mV o a +40 mV durante periodos de 3min antes de la estimulación con Oxo-M. Los valores representan la media $\pm$ ESM de las corrientes normalizadas respecto a las obtenidas en 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . La significación estadística de la diferencia de las medias (respecto al valor registrado en 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  en A, y respecto al valor obtenido al potencial de -90 mV en B) aparece indicada mediante asteriscos. \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ; \*\*\*,  $p<0,005$ .

Por otra parte, no fue posible apreciar una relación clara entre la magnitud de las corrientes activadas por ACh y registradas a un potencial de fijación de -90 mV y la

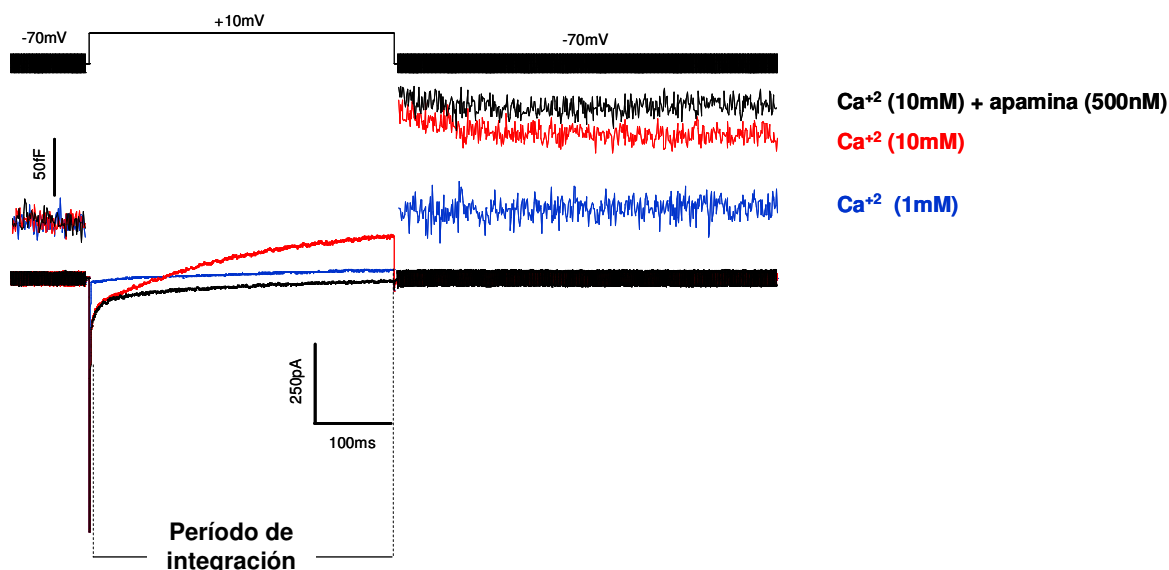
concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Fig. 4.17 A**); sin embargo, el hecho de que se observe una potenciación de las corrientes a un potencial de +40 mV en células expuestas a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de 3 y 10 mM (**Fig. 4.17 B**), es probablemente indicativo de la existencia de un fenómeno facilitador dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que se evidenciaría al suprimir por la despolarización un efecto bloqueador coexistente a ambas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.



**Figura 4.17.** Modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de las corrientes inducidas por ACh (100  $\mu\text{M}$ ). **A.** Respuestas obtenidas en células superfundidas con distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (0,3, 1, 3, 10, y 20 mM) y mantenidas a un potencial de fijación de -90 mV. **B.** Efecto del voltaje sobre las respuestas inducidas por ACh en células bañadas en soluciones conteniendo 3 ó 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . El potencial de membrana de las células se fijó a -90 mV ó +40 mV durante períodos de 3 min antes de ser estimuladas con ACh. Los valores representan la media  $\pm$  ESM de las corrientes normalizadas respecto a las obtenidas en 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . La significación estadística de la diferencia de las medias (respecto a la columna correspondiente a 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  en A, y respecto al valor registrado a -90 mV en B) aparece indicada mediante asteriscos. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ .

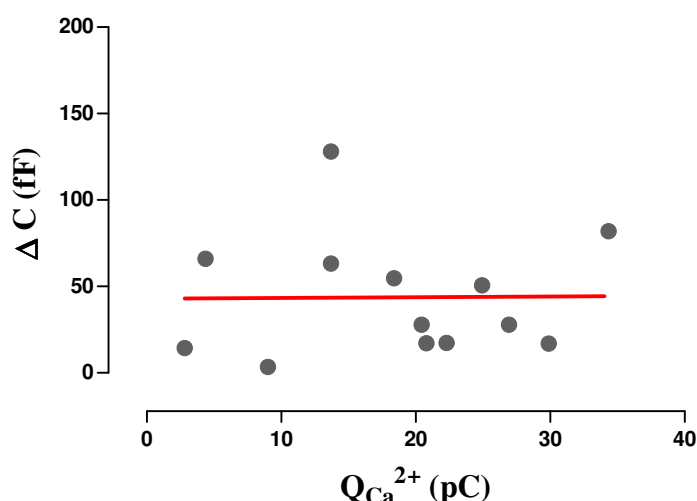
#### 4.7. Acoplamiento de la corriente nicotínica con la respuesta secretora de las células cromafines de la rata

La elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor nicotínico  $\alpha_9\alpha_{10}$  plantea la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{2+}$  que accede al interior celular a través de este receptor sea eficaz para desencadenar la liberación exocitótica de las catecolaminas. Para el estudio del acoplamiento de la respuesta nicotínica con la respuesta secretora se recurrió a la variante del parche perforado –con anfotericina B– de la configuración de célula completa, que permite el registro prolongado tanto de la actividad eléctrica como de los cambios en la capacitancia de la membrana celular, siendo este último parámetro un indicador de la exocitosis<sup>(13)</sup>. A efectos de verificar la capacidad secretora de las células cromafines, se indujo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante despolarizaciones (hasta +10 mV durante 400 ms) que activan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. En células dializadas con una solución intracelular con un alto contenido de  $\text{Cs}^+$ , que bloquea la mayoría de los canales de  $\text{K}^+$ , la despolarización eléctrica de la membrana celular origina una corriente de entrada, rápida y transitoria, dependiente del flujo de  $\text{Na}^+$  a través de canales de  $\text{Na}^+$  activados por el voltaje (**Fig. 4.18**). Una vez inactivada la corriente de  $\text{Na}^+$ , es posible observar en células superfundidas con una solución conteniendo una concentración 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  una pequeña corriente de entrada que persiste mientras dura la despolarización. Esta corriente es atribuible a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y alto umbral de activación y es la responsable del incremento de capacitancia celular que se observa en un elevado porcentaje de células<sup>(122)</sup>. La elevación de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 10 mM se asoció a un incremento notable de la respuesta de capacitancia y a la aparición de una corriente de salida de la célula durante el pulso despolarizante. Esta corriente se debe a la salida de iones  $\text{Cs}^+$  a través de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y de pequeña conductancia iónica (canales SK) que son activados por la acumulación en el citosol de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que entran durante la despolarización<sup>(123)</sup>. Esta interpretación es consiguiente con el efecto de apamina (500 nM), un bloqueador selectivo de los canales SK, que abole la corriente de salida permitiendo que “aflore” una corriente sostenida e incrementada de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sin afectar a la respuesta secretora (**Fig. 4.18**).



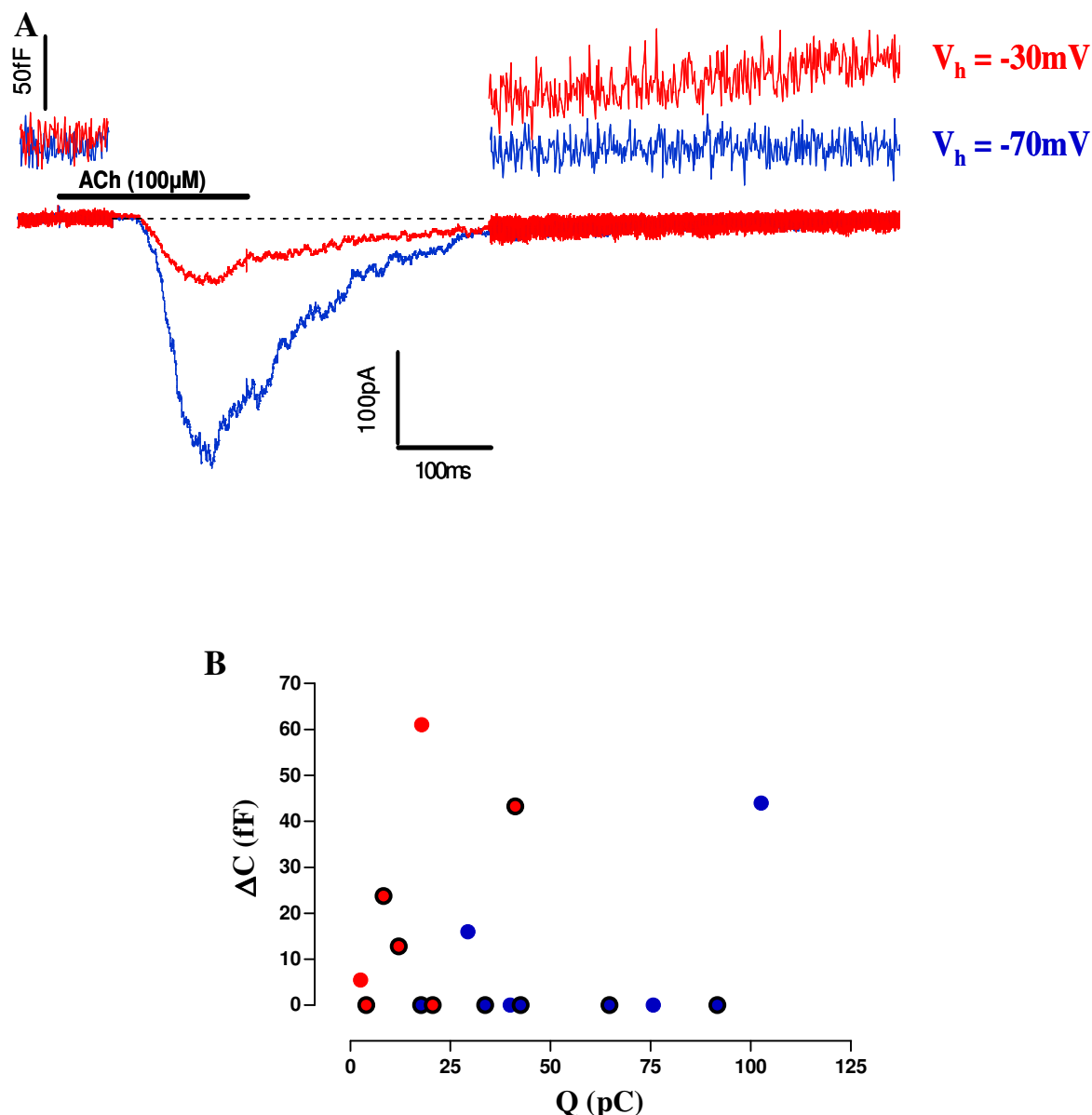
**Figura 4.18.** Corrientes iónicas y respuesta secretora inducidas por la despolarización de la membrana de una célula cromafín de la rata. En el trazo superior se muestra el protocolo de voltaje. Los segmentos gruesos que aparecen a ambos lados del pulso despolarizante hasta +10 mV representan los pulsos sinusoidales empleados para estimar la capacitancia celular. Los tres trazos intermedios representan la capacitancia celular antes y después del pulso despolarizante mientras que los trazos inferiores muestran las corrientes iónicas a través de la membrana celular. Cada registro de corriente presenta su correspondiente registro de capacitancia, identificable por tener el mismo color (véase el texto para obtener información adicional). Se indica también el período de tiempo escogido para el cálculo de la integral de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Más del 90% de las células bañadas en una solución conteniendo 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  mostraron una respuesta secretora al ser estimuladas con este protocolo. Tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , medida como la carga de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $Q_{\text{Ca}^{2+}}$ ), como la respuesta exocitósica que produce presentaron una importante variación entre las distintas células estudiadas ( $18,59 \pm 2,76$  pC y  $43,78 \pm 10,11$  fF ( $n=13$ ), respectivamente). No obstante, cuando se representa en un sistema de ordenadas ambas magnitudes para todas las células analizadas es posible determinar mediante regresión lineal un valor medio de 43 fF para la respuesta secretora del conjunto de la población celular (**Fig. 4.19**). Es de destacar que este valor es similar al propuesto para el contingente de vesículas de liberación rápida en las células cromafines de la rata, y que sería liberado durante despolarizaciones de duración superior a 100 ms<sup>(108)</sup>.



**Figura 4.19.** Relación entre la carga a través de canales dependientes de voltaje de la corriente de  $Ca^{2+}$  ( $Q_{Ca}$ ) y el cambio de la capacitancia ( $\Delta C$ ) de las células cromafines de la rata.  $Q_{Ca}$  representa la integral de la corriente de  $Ca^{2+}$  inducida por una despolarización de 400 ms hasta +10 mV. El período de integración comenzó una vez completada la inactivación de la corriente de  $Na^+$  y se extendió hasta el final del pulso despolarizante. Los valores representan los resultados obtenidos en 13 células superfundidas con una solución conteniendo 10 mM de  $Ca^{2+}$  y apamina (500 nM). El trazo rojo representa la regresión lineal realizada con estos valores y refleja el valor medio del incremento de capacitancia (43fF).

A continuación se procedió a inducir la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula mediante la activación de los receptores nicotínicos a fin de evaluar el posible acoplamiento entre las corrientes nicotínicas y la respuesta secretora. La activación del conjunto de los nAChRs de la célula cromafín con ACh (100  $\mu$ M durante 250 ms y a un  $V_h$  de -70 mV), dando lugar a incrementos mensurables de capacitancia ( $\Delta C > 10$  fF) solamente en un 22 % de las células (**Fig. 4.20 A**). Sin embargo, la aplicación de ACh a células con el potencial de membrana pinzado a -30 mV durante 5s (potencial umbral para la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje) fue capaz de inducir un incremento de capacitancia en el 57 % de las células (**Fig. 4.20 B**) a pesar de reducirse la amplitud de la corriente nicotínica como consecuencia de la menor fuerza electromotriz del  $Na^+$  y del  $Ca^{2+}$  al potencial de -30 mV.

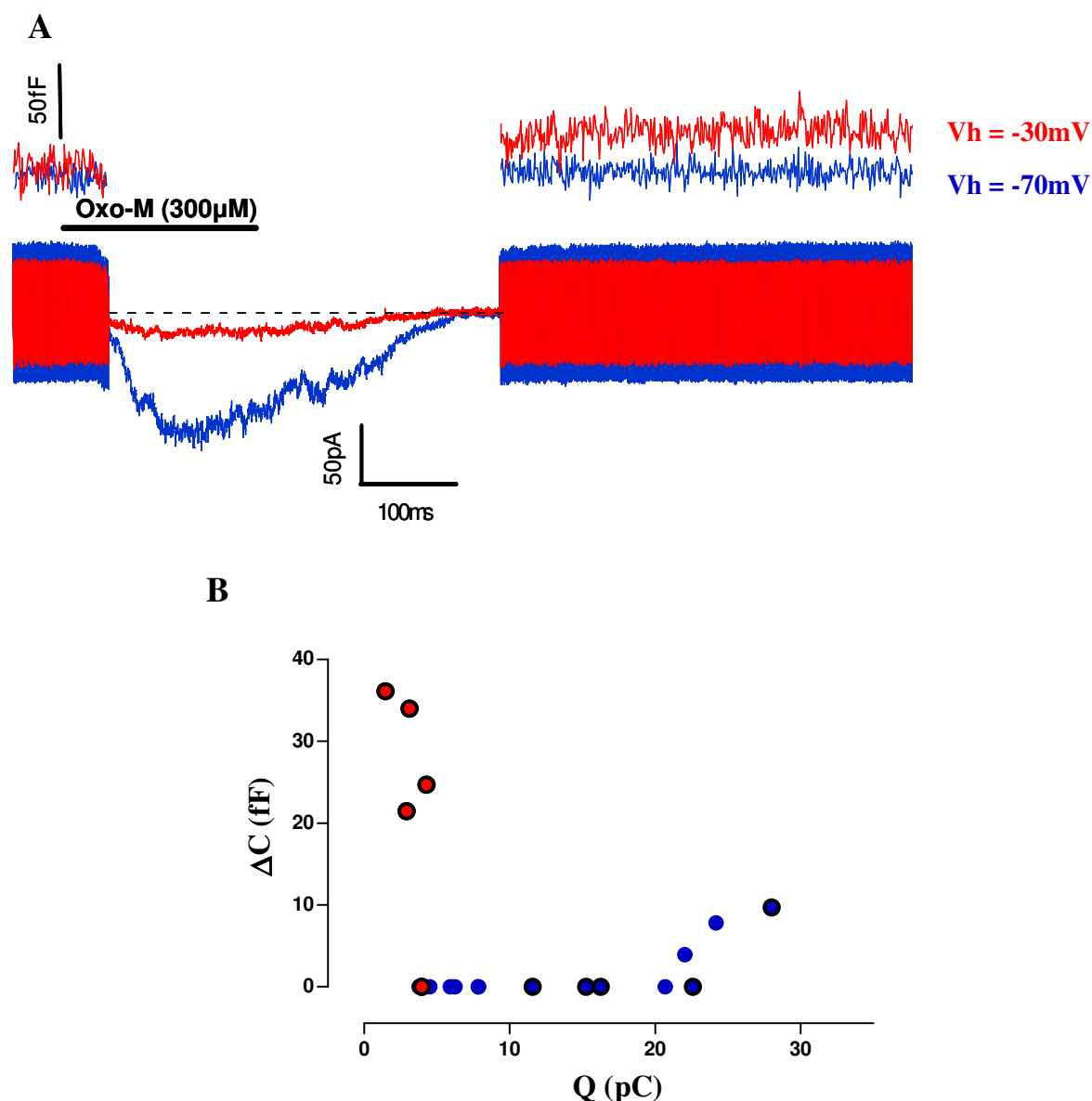


**Figura 4.20.** Acoplamiento de las corrientes nicotínicas con la respuesta secretora. **A.** Registro representativo de las respuestas de corriente y de los incrementos de capacitancia producidos por la administración de un pulso de ACh (100μM) durante 250 ms a una célula cromafín con el potencial de membrana pinzado a -70 mV (trazo azul) o a -30 mV (trazo rojo). **B.** Relación entre la carga eléctrica de la corriente nicotínica (Q) y los cambios de capacitancia (ΔC). A efectos del cálculo de Q el período de integración de la corriente nicotínica fue el comprendido entre los pulsos sinusoidales. Los datos representan el valor medio de las respuestas de una célula a dos estímulos consecutivos administrados con un intervalo de 45 segundos; los puntos azules representan los datos obtenidos a -70mV, los rojos corresponden a los obtenidos a -30 mV, mientras que los puntos bordeados en negro indican las células en las que los registros se realizaron a ambos potenciales (-70 y -30 mV).

El estudio de la contribución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  a la respuesta secretora se realizó de forma similar a la descrita para el conjunto de los nAChRs. La administración de Oxo-M (300 μM) durante 250ms a células cromafines con el potencial fijado a -70mV indujo un incremento mensurable de capacitancia en tan solo el



14% de las células, si bien la predespolarización de la membrana celular durante 5s hasta -30mV y posterior administración del agonista a ese mismo potencial se asoció a un incremento de la capacitancia en el 80 % de las células (Fig. 4.21).



**Figura 4.21.** Acoplamiento de la corriente nicotínica  $\alpha_9\alpha_{10}$  con la respuesta secretora en células cromafines. **A.** Registro representativo de las respuestas de corriente y los incrementos de capacitancia producidos por la administración de un pulso de Oxo-M (300 μM) de 250ms en una célula cromafín con el potencial de membrana pinzado a -70 mV (trazo azul) ó a -30 mV (trazo rojo). **B.** Relación entre la carga (Q) y los cambios de capacitancia celular (ΔC). El período de integración de la corriente nicotínica fue el comprendido entre los pulsos sinusoidales. Los datos representan el valor medio de las repuestas de una célula a dos estímulos consecutivos administrados con un intervalo de 45segundos; los puntos azules representan los datos obtenidos a -70mV, los rojos corresponden a los registrados a -30mV, mientras que los puntos bordeados en negro indican las células en las que los registros se realizaron a -70 y a -30 mV.

## Capítulo V: Discusión

El presente trabajo se encuadra en una línea de investigación sobre la “Farmacología de los receptores nicotínicos” que, en última instancia, aspira al desarrollo de fármacos selectivos para los distintos tipos de nAChRs y potencialmente útiles para el tratamiento de múltiples entidades nosológicas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, dolor, adicción tabáquica, etc.) con prevalencia creciente en las sociedades desarrolladas. Más concretamente, este trabajo se suma al de otros laboratorios interesados en la caracterización molecular, farmacológica, biofísica e indagación del significado funcional de los nAChRs presentes en las células cromafines de la médula adrenal de los mamíferos. Las células cromafines constituyen un modelo ampliamente utilizado desde hace más de 40 años para el estudio de la farmacología colinérgica y de la neurosecreción<sup>(11,18)</sup>. Es de destacar que las primeras indagaciones sobre la naturaleza ganglionar de los receptores nicotínicos de las células cromafines datan de los años 70 del siglo pasado<sup>(124)</sup>, y que el empleo de la  $\alpha$ -BgTx en este modelo celular se remonta al comienzo de la década de los 80<sup>(125)</sup>. Asimismo, los primeros registros electrofisiológicos de corrientes unitarias a través de nAChRs neuronales se llevaron a cabo en las células cromafines<sup>(126)</sup>. En la actualidad, las células cromafines siguen constituyendo un buen modelo para el estudio de los nAChRs neuronales dada la diversidad de los que expresan<sup>(64,72,73)</sup> y para la investigación de su significado funcional a tenor de las ventajas que ofrecen para el estudio de la respuesta neurosecretora<sup>(13,65,127,128)</sup> y de los mecanismos de la neuroprotección<sup>(129)</sup>. En este trabajo se ha puesto el énfasis en tres aspectos relacionados con los nAChRs: i) la identificación molecular y caracterización farmacológica de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  en las células cromafines de la rata; ii) la selectividad iónica de los nAChRs de dicha preparación, incluyendo el subtipo  $\alpha_9\alpha_{10}$ , y iii) la participación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs en la respuesta secretora de estas células. Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia a favor de la expresión de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  en estructuras del sistema nervioso vegetativo; asimismo, suponen la primera confirmación –la información original se obtuvo en las células ciliadas de la cóclea– de la elevada permeabilidad al ión  $\text{Ca}^{2+}$  de los receptores  $\alpha_9\alpha_{10}$  nativos y vinculan dicha permeabilidad con una contribución directa a la respuesta exocitótica de las células cromafines<sup>(132)</sup>.

### 5.1. Caracterización farmacológica e identificación molecular del nAChR $\alpha_9\alpha_{10}$ en las células cromafines de la rata

La caracterización de los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  se ha visto favorecida por la peculiar farmacología de los mismos, que les lleva a compartir propiedades tanto con los receptores nicotínicos como con los muscarínicos. Así, la ACh, el neurotransmisor colinérgico, y otros agonistas de acción mixta como el carbacol son capaces de activarlos con eficacias máximas. Más significativo es el hecho de que agonistas nicotínicos típicos, como el dimetilfenilpiperacinio (DMPP) y la Cho, o el clásico agonista muscarínico Oxo-M se comporten como agonistas parciales de estos receptores. Análogamente, diversos antagonistas tanto nicotínicos (d-Tub, MLA o  $\alpha$ -BgTx) como muscarínicos (atropina) son capaces de inhibir las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ . Aún más llamativo –y útil desde el punto de vista experimental– resulta el hecho de que agonistas colinérgicos prototípicos como la Nic o la muscarina se comporten como antagonistas de estos receptores. Finalmente, y dada la similitud estructural entre las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  y los receptores GABA<sub>A</sub>, de glicina y 5HT<sub>3A</sub><sup>(130)</sup>, no es de extrañar que los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  también sean bloqueados por fármacos antagonistas gabérgicos (bicuculina), glicinérgicos (estricnina) o de receptores 5-HT<sub>3A</sub> (tropisetron y ICS-205,930)<sup>(71,76,130,131,133,134)</sup>.

La caracterización farmacológica se ha visto también facilitada por el empleo de un sistema de perfusión rápida de fármacos que posibilita el recambio de la solución en la vecindad de la célula en estudio en tiempos de 30-50ms, y la elaboración de protocolos de estimulación con pulsos breves (100-500ms) y recuperación completa de la desensibilización entre pulsos consecutivos. Ello ha permitido el registro de respuestas apenas atenuadas por la desensibilización de los nAChRs y el cálculo de la CE<sub>50</sub> para diversos fármacos agonistas con distinta selectividad sobre los nAChRs. Así, la ACh un agonista *universal* de los nAChRs presentó una CE<sub>50</sub> de 63  $\mu$ M, un valor similar a los obtenidos por Hirano y col. (1987)<sup>(105)</sup> y Nooney y col. (1992)<sup>(106)</sup> en células cromafines de rata (135  $\mu$ M) y vaca (60  $\mu$ M), respectivamente. Resulta también destacable la observación de una corriente de rebote (“rebound”) al interrumpir la administración de ACh a elevadas concentraciones (> 100  $\mu$ M). Este fenómeno refleja la capacidad de la ACh y de otros agonistas de pequeño tamaño molecular y que se ionizan positivamente al pH fisiológico para bloquear el poro del canal, comportándose, en consecuencia, como

antagonistas no competitivos del receptor<sup>(135)</sup>. La corriente de rebote sería el resultado del desbloqueo de los canales antes del cierre (desactivación) de los mismos al retirar el agonista<sup>(136)</sup>. Por su parte, la Nic es un agonista de amplio espectro de los nAChRs con la excepción de los formados por las subunidades  $\alpha_{10}$  y  $\alpha_{10}$ . Su  $CE_{50}$  fue de 24  $\mu M$ , si bien este valor podría haber sido sobreestimado en función de la marcada desensibilización que este agonista produce y que se manifestó en la disminución de la respuesta al elevar la concentración de Nic por encima de 150  $\mu M$ <sup>(137)</sup>.

La Cho es un compuesto endógeno que resulta de la hidrólisis de la ACh pero que también sirve como precursor en su síntesis. Además de ser reconocida por la colinoacetilasa, la Cho interactúa con los nAChRs, comportándose como agonista puro de los  $\alpha_7$ <sup>(66,138)</sup> y parcial (eficacia del 50%) de los  $\alpha_9\alpha_{10}$ <sup>(71,76,93)</sup>. La Cho se comportó como un agonista escasamente potente ( $CE_{50}$  de 2393  $\mu M$ ) sobre las células cromafines de la rata, generando una respuesta máxima a 10 mM que fue del 13% de la producida por la ACh. El último de los agonistas para el que se obtuvo la curva dosis-respuesta fue la Oxo-M, un derivado con amonio cuaternario de la oxotremorina clásicamente conocido por sus efectos muscarínicos. Como ya ha sido mencionado, la Oxo-M es también capaz de activar los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  si bien con reducida eficacia (5%)<sup>(71,76)</sup>. La Oxo-M indujo en las células cromafines de rata corrientes de entrada con amplitud máxima del 27% de la observada con la ACh y con potencia intermedia ( $CE_{50}$  de 507  $\mu M$ ) respecto a la mostrada por los otros tres agonistas.

El hecho de que diversos fármacos agonistas con diferente selectividad por los distintos tipos de nAChRs induzcan respuestas con magnitudes máximas notablemente dispares, resulta indicativo de la heterogeneidad de los nAChRs expresados por las células cromafines de la rata. Estos resultados son congruentes con los publicados por otros cuatro grupos de investigación<sup>(16,64,72,139,140)</sup>, que, basándose en evidencias tanto de tipo funcional –registros de corrientes iónicas, monitorización de la exocitosis de catecolaminas– como molecular –amplificación mediante RT-PCR del ARNm–, han propuesto que los nAChRs predominantes en las células cromafines de la rata serían los de tipo ganglionar ( $\alpha_3\beta_4(\alpha_5)$  y  $\alpha_3\beta_2(\alpha_5)$ ) y el  $\alpha_7$ . Debemos señalar que los resultados funcionales que sugieren la expresión de nAChRs  $\alpha_7$  en las células cromafines de rata se han basado exclusivamente en la utilización de  $\alpha$ -BgTx, una toxina que bloquea con extraordinaria potencia tanto los nAChRs  $\alpha_7$  ( $CI_{50}$  de 1,9 nM)<sup>(131,141)</sup> como los formados por las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  ( $CI_{50}$  de 6-64 nM)<sup>(71,76,91,95,131)</sup>. Existe, no obstante, una particularidad del efecto bloqueante de

esta toxina que puede ser de utilidad para identificar la diana sobre la que actúa: la  $\alpha$ -BgTx se combina con el nAChRs  $\alpha_7$  de manera esencialmente irreversible<sup>(142)</sup> mientras que su efecto sobre los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  es característicamente revertido en pocos minutos de lavado<sup>(71,76,91)</sup>.

La  $\alpha$ -BgTx bloqueó parcialmente (30%) y con una  $CI_{50}$  de 68,8 nM las corrientes inducidas por ACh en las células cromafines de la rata. Además, el efecto bloqueante fue parcialmente reversible. Más significativo en relación con la posible presencia de nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  funcionales en las células cromafines de la rata, fue que el efecto de  $\alpha$ -BgTx sobre las corrientes inducidas por Oxo-M resultó mayor (40%), mas potente ( $CI_{50}$  de 3,13 nM) y, sobre todo, completamente reversible. Por otro lado, el hecho de que el GTS-21, un agonista selectivo de los nAChRs  $\alpha_7$ <sup>(136,143)</sup>, fuera ineficaz para inducir una respuesta de corriente en la práctica totalidad de las células estudiadas, permite descartar a los nAChRs  $\alpha_7$  como la principal diana de la acción de la  $\alpha$ -BgTx en esta preparación. Ambos resultados, al tiempo que sugieren fuertemente la existencia de nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  en las células cromafines de la rata, avalan a la Oxo-M como agonista selectivo de los mismos. Interesa señalar que la Oxo-M se ha mostrado eficaz para inducir corrientes iónicas de rápida activación en más del 90% de las células en la que se ha empleado (sobre una muestra total de varios centenares), lo que indica que si bien los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  pueden constituir una población minoritaria dentro del conjunto de los nAChRs de las células cromafines de la rata, su expresión se produce de forma generalizada.

Un fármaco que presenta un comportamiento único y paradójico sobre los nAChRs constituidos por las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  es la Nic. La Nic es comúnmente considerada un agonista universal del que tomaron el nombre los nAChRs. Sin embargo, existe actualmente una sólida evidencia sobre su comportamiento como antagonista puro de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ , tanto nativos como recombinantes<sup>(71,76,91,95)</sup>. La existencia en las células cromafines de múltiples tipos de nAChRs sobre los que la Nic puede actuar tanto como agonista (receptores ganglionares y  $\alpha_7$ ) o como antagonista (nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ ), llevó a explorar su posible efecto antagonista mediante el empleo de diseños experimentales basados en la desensibilización previa de los nAChRs *no*  $\alpha_9\alpha_{10}$ . La Nic, a una concentración 10  $\mu$ M, inhibió un 90% de las corrientes inducidas por la Oxo-M. Este efecto, que alcanzó una magnitud muy inferior sobre las corrientes inducidas por la ACh, refuerza la argumentación a favor de la Oxo-M como agonista selectivo de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  presentes en esta preparación.

La caracterización farmacológica de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  de la célula cromafín de rata se completó mediante la utilización de una serie de compuestos con efectos bien conocidos sobre dicho tipo de receptor. En primer lugar, la capacidad de la d-Tub para suprimir las corrientes inducidas por Oxo-M es demostrativa de la naturaleza nicotínica de las mismas, excluyéndose la participación de otros tipos de receptores en su génesis. En segundo lugar, se evaluaron los efectos de MLA, un compuesto que a concentraciones inferiores a 100nM presenta un perfil farmacológico superponible al de la  $\alpha$ -BgTx<sup>(71,76,131,144)</sup>. La MLA (100nM) inhibió de forma reversible un 82% de las corrientes inducidas por Oxo-M. Por último, la atropina, un antagonista muscarínico, y la estricnina, un antagonista glicinérgico, bloquearon las respuestas inducidas por Oxo-M en las células cromafines de rata, en consonancia con los efectos de ambos fármacos descritos para los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ . En definitiva, se puede considerar que, en conjunto, las evidencias farmacológicas obtenidas permiten concluir que las células cromafines de la rata expresan nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  funcionales que son activados selectivamente por la Oxo-M.

Para la identificación de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  de las células cromafines hemos recurrido también a técnicas de biología molecular consistentes en la amplificación mediante RT-PCR del ARNm codificante de varias de las subunidades de los nAChRs neuronales ( $\alpha_3$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$ ). Con el fin de establecer una cierta correlación fármacológica-molecular, el proceso de amplificación se llevó a cabo partir del citoplasma de células individuales en las que se había constatado una respuesta de corriente a la Oxo-M. En el 100% de la células analizadas (n=52) fue posible detectar la presencia de ARNm codificante para  $\alpha_9$ , mientras que la subunidad  $\alpha_{10}$  fue detectada en el 88% de ellas. Por su parte, las subunidades  $\alpha_7$  y  $\alpha_3$  fueron amplificadas en el 78 y 54% de las células, respectivamente. Estos resultados son claramente confirmatorios de los de índole farmacológica y permiten especular sobre la composición de los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  en las células cromafines de la rata. Dos son los argumentos que pueden esgrimirse a favor de un nAChR  $\alpha_9\alpha_{10}$  heteromérico predominante respecto al homomérico  $\alpha_9$ . En primer lugar, cabe apuntar que si bien el elevado grado de homología (80%) del dominio extracelular de las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  determina un perfil farmacológico extraordinariamente similar entre el receptor homomérico  $\alpha_9$  y el heteromérico  $\alpha_9\alpha_{10}$ , existen pequeñas diferencias que pudieran ayudar a distinguirlos. En particular, cabe referirse a la Nic como un antagonista 10 veces más potente sobre el nAChR  $\alpha_9\alpha_{10}$  (CI<sub>50</sub> de 4  $\mu$ M) que sobre el nAChR  $\alpha_9$  (CI<sub>50</sub> de 32-41  $\mu$ M)<sup>(71,134)</sup>. La

observación de que las respuestas de corriente inducidas por Oxo-M son bloqueadas por Nic a la concentración de  $10\mu\text{M}$ , sugiere que el nAChR activado por Oxo-M es el heteromérico  $\alpha_9\alpha_{10}$ ; así mismo, el hecho de que en el 88% de las células cromafines analizadas se haya detectado ARNm de ambas subunidades da verosimilitud al anterior razonamiento. La composición propuesta para los nAChRs adrenomedulares formados por las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  es además coincidente con la actualmente aceptada de los nAChRs nativos de las células ciliadas de la cóclea de rata<sup>(92,95)</sup>.

## 5.2. Selectividad iónica de los nAChRs de las células cromafines de la rata

La selectividad iónica constituye una de las señas de identidad de cualquier canal iónico y puede ayudar a la comprensión de su significado funcional. La selectividad iónica de los nAChRs está determinada por la existencia de tres anillos formados por aminoácidos cargados negativamente y situados a lo largo del segmento transmembrana  $M_2$  que forma el poro iónico<sup>(145,146,147,148,149)</sup>. Los nAChRs se comportan como canales iónicos no selectivos para cationes, dejando pasar a su través a numerosos compuestos monovalentes de pequeño tamaño –incluyendo ciertos cationes orgánicos– así como a algunos átomos divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.)<sup>(52,150)</sup>. La permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de los nAChRs neuronales es un aspecto que presenta una notable trascendencia fisiológica y que permite subdividir a estos receptores en dos grandes grupos: (1) nAChRs con elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 6-20 y entrada fraccional de  $\text{Ca}^{2+}$ , Pf de 8-22%) constituidos por las subunidades  $\alpha_7$ - $\alpha_{10}$ , sensibles a la  $\alpha$ -BgTx, y capaces de formar canales homoméricos, y (2) nAChRs con permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  reducida ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 0,6-3,8, y Pf de 1,5-5%), constituidos por al menos una subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_2$ - $\alpha_6$ ) y una  $\beta$  ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ) y resistentes a la  $\alpha$ -BgTx<sup>(58,151)</sup>.

Se ha abordado el estudio de la selectividad iónica ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Tris}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) de los nAChRs de las células cromafines de la rata mediante la determinación de los  $E_{\text{rev}}$  de la corrientes inducidas bajo distintas condiciones iónicas (curvas I/V) tanto por la ACh, capaz de activar al conjunto de los nAChRs, como por la Oxo-M, que activaría preferentemente los nAChR  $\alpha_9\alpha_{10}$ . Los valores de  $E_{\text{rev}}$  fueron utilizados para el cálculo de las distintas razones de permeabilidad ( $P_X/P_{\text{Na}}$ ) mediante la ecuación de GHK para voltaje. Al objeto de lograr la máxima precisión en nuestros cálculos, se corrigieron los valores de  $E_{\text{rev}}$  obtenidos experimentalmente en función de los potenciales de difusión de los diversos



pares de soluciones empleadas, y se sustituyeron las concentraciones de las sales en solución por las correspondientes actividades iónicas. Sin embargo, se desestimó la posible contribución del  $K^+$  (2,8 mM) y el  $Mg^{2+}$  (1 mM) extracelulares al  $E_{rev}$ , y no se aplicó corrección alguna para la influencia del potencial de superficie debido a la falta de información sobre la densidad de carga de superficie de la membrana de las células cromafines<sup>(106)</sup>.

La curva I/V obtenida tras la administración de ACh a células bañadas en soluciones iónicas de referencia (140 mM  $Na^+_o$  y 141 mM  $Na^+_i$ ) presentó una marcada rectificación de entrada y un comportamiento bifásico a potenciales positivos a  $E_{rev}$  (-1,74mV), evidenciable por una región de conductancia mínima e incluso pendiente negativa hasta +40mV seguida de otra con conductancia creciente con el potencial de membrana. Conviene señalar que las curvas I/V mostraron esta fisonomía independientemente de las soluciones y del agonista (ACh u Oxo-M) utilizados. La rectificación de entrada de la corriente nicotínica ha sido previamente observada en las células cromafines de la rata<sup>(105)</sup> y la vaca<sup>(106)</sup> así como en muy diversas preparaciones que expresan nAChRs neuronales<sup>(70,152,153,154)</sup>, habiendo sido atribuida al bloqueo dependiente de voltaje del poro iónico por poliaminas intracelulares (espermidina, espermidinina)<sup>(147,155,156)</sup>. Por otra parte, la rectificación de entrada es contrarrestada por el  $Ca^{2+}$  extracelular, que reduce la conductancia del canal a potenciales hiperpolarizados<sup>(157)</sup>, como pudimos observar cuando incrementamos la concentración de dicho catión hasta 10mM. La presencia de rectificación de entrada es también una característica de los nAChR  $\alpha_9\alpha_{10}$  que permite su diferenciación de los  $\alpha_9$ , ya que éstos no la presentan<sup>(71,76,95)</sup>. El hecho de que la Oxo-M induzca sistemáticamente corrientes con una clara rectificación de entrada es otro argumento a favor de la existencia de nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  heteroméricos en las células cromafines de la rata.

Las razones de permeabilidad calculadas para los distintos cationes monovalentes cuando el agonista empleado fue la ACh apenas difieren de las publicadas para las células cromafines de la vaca<sup>(106)</sup>, de la rata<sup>(105)</sup> o la placa motora de la rana<sup>(53)</sup>. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar las secuencias de permeabilidad obtenidas con la ACh y la Oxo-M. Dada la heterogeneidad de los nAChRs presentes en las distintas preparaciones mencionadas y de los agonistas utilizados, es posible concluir que los nAChRs no muestran diferencias relevantes en su capacidad para discriminar entre pequeños cationes monovalentes. Una situación bien distinta aparece, no obstante, al

considerar la permeabilidad relativa al  $\text{Ca}^{2+}$ . Para el conjunto de los nAChRs de la célula cromafin de la rata se ha estimado una  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 3,3 (1 mM  $\text{Ca}^{2+}_o$ ). Este valor es similar a los previamente publicados para las células cromafines de rata (Pf de 4,1% en 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}_o$ )<sup>(158)</sup>, de vaca ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 2,5 en 1 mM  $\text{Ca}^{2+}_o$ )<sup>(106)</sup>;  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 1,5<sup>(159)</sup>; Pf de 2,5 en 1 mM  $\text{Ca}^{2+}_o$ <sup>(160)</sup>, y para las células PC12, una línea celular derivada del feocromocitoma de rata, un tumor de las células cromafines de la médula adrenal ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 2,5)<sup>(153)</sup>. Sin embargo, los receptores activados por Oxo-M presentaron una  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 8,9 (1mM  $\text{Ca}^{2+}_o$ ), tres veces mayor que la del conjunto de los nAChRs. Esta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  es prácticamente igual a la descrita para los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  nativos de las IHC de la cóclea de la rata ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 8) y similar a la de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  recombinantes expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 9-14,5)<sup>(91,94)</sup> o en las células GH4C1 de la hipófisis (Pf del 22%)<sup>(58)</sup>. Por otra parte, contrariamente a lo que cabría esperar de respetarse el principio de independencia en el permeación de canales iónicos<sup>(161)</sup>, la elevación de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 10 mM se asoció a una disminución en la  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  tanto para los nAChRs activados por ACh (2,17) como por Oxo-M (3,44). Si bien estos resultados permiten concluir que el nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  de las células cromafines de la rata presenta una elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , este catión es también capaz de interactuar con los nAChRs para modificar la actividad de los mismos.

### 5.3. Modulación de los nAChRs de las células cromafines de la rata por $\text{Ca}^{2+}$ extracelular

Es bien conocido que la modificación de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (rango desde 0,1 hasta 60 mM) puede producir efectos opuestos –inhibición y potenciación– sobre la actividad de los nAChRs, que obedecen a mecanismos distintos. El efecto inhibitorio manifiesta dependencia de voltaje, siendo mayor a potenciales negativos que a los positivos, y se debe a la interacción de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  con las paredes del poro iónico en el seno del campo eléctrico de la membrana<sup>(93,157,159,162,163)</sup>. Por el contrario, la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  es independiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y del potencial de membrana, y se ejerce a nivel de un sitio alostérico del nAChRs situado extracelularmente<sup>(94,159,164,165)</sup>. Dependiendo del tipo celular, ambos efectos pueden coexistir o presentarse solo uno de ellos, y manifestarse en el mismo o distinto rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Esta variedad de resultados probablemente refleja modos particulares de interacción del

$\text{Ca}^{2+}$  con los distintos nAChRs expresados en las diferentes preparaciones. Un efecto dual –inhibidor y potenciador– del  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido observado sobre los nAChRs  $\alpha_7$  de las neuronas del ganglio ciliar del pollo<sup>(166)</sup> y sobre los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  tanto nativos<sup>(95)</sup> como recombinantes<sup>(94)</sup>. En el caso de muchos otros nAChRs neuronales ( $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_3\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta_4$ ,  $\alpha_4\beta_4$ ,  $\alpha_7$ ), nativos como el del núcleo de la habénula de la rata o expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, sólo se constata un efecto potenciador del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre las corrientes macroscópicas<sup>(158,159,164,165,167)</sup>. Finalmente, sobre el nAChRs muscular y sobre el homomérico  $\alpha_9$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ejerce exclusivamente un efecto bloqueante<sup>(93,163)</sup>.

Por otra parte, los dos únicos trabajos publicados hasta la fecha sobre el efecto modulador del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre los nAChRs de las células cromafines ofrecen resultados dispares. Mientras Vernino y col. (1992)<sup>(159)</sup> observan un efecto exclusivamente potenciador y creciente con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (desde 0,3 mM hasta 30 mM) sobre las corrientes inducidas por ACh en las células cromafines de la vaca, Zhou y Neher (1993)<sup>(160)</sup> refieren un efecto bifásico, con potenciación entre 0,5 y 2 mM y reducción entre 2 y 5mM, en células cromafines de la misma especie animal. Los resultados de este trabajo, obtenidos en células cromafines de la rata, reflejan efectos distintos del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular dependiendo del lote de células y del agonista empleado (ACh u Oxo-M). Cuando el agonista empleado fue la Oxo-M, las células cromafines presentaron dos patrones de respuesta diferentes al elevar la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  desde 0,3 hasta 20 mM. Así, en 3 de los cultivos celulares utilizados, la corriente inducida por Oxo-M se incrementó con la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  entre 1 y 10mM, experimentando una disminución a la concentración de 20 mM. En los restantes cultivos (3) también se pudo observar un efecto dual del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, consistente en una ligera potenciación a la concentración de 3mM seguida de una marcada inhibición a la de 10 mM. Mientras que el efecto bloqueante observado en presencia de 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular mostró dependencia de voltaje pues fue revertido con la despolarización, el efecto potenciador fue independiente de voltaje alcanzando la misma magnitud con independencia del potencial de membrana (-90 ó +40 mV). Este resultado es indicativo de la existencia de dos efectos moduladores mecanísticamente distintos y similares a los comentados previamente. Ambos procesos también ocurrirían a nivel de la totalidad de los nAChRs de la célula cromafín a juzgar por la facilitación de la corriente inducida por ACh cuando se fija el potencial de la membrana a +40 mV. Sin embargo, la multiplicidad de nAChRs presentes en este tipo celular y que son activados por ACh impediría que

cualquiera de ellos predominase en el rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular empleado.

Los resultados obtenidos con Oxo-M son en líneas generales compatibles con los datos publicados sobre la modulación de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  recombinantes<sup>(94)</sup> y nativos de las células IHC de la cóclea de la rata<sup>(95)</sup>. La principal diferencia estriba en el rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en las que se observan. La máxima potenciación de los nAChRs cocleares se observa a la concentración de 0,5mM, que es de 6 a 20 veces menor que la que se requiere (3 ó 10 mM) en las células cromafines de la rata. El segundo aspecto diferencial sería precisamente la variación en la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  entre los distintos de lotes de células cromafines. Aunque en la literatura se ha referido que el rango de concentraciones en el que se observa la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  de la cóclea del pollo se extiende hasta 60 mM<sup>(96)</sup>, se cree que esta diferencia de especie difícilmente sería aplicable en este caso, ya que comparamos respuestas en dos tipos celulares distintos, las células cromafines de la médula adrenal y las células IHC de la cóclea, pero pertenecientes a una misma especie animal, la rata. Por eso, se puede pensar que son las diferencias en el procesamiento –afectando a la síntesis, plegamiento, ensamblaje, incorporación a la membrana, glicosilación y fosforilación, etc. –de las subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$  entre ambos tejidos, e incluso dentro de la propia médula adrenal, las que mejor pueden explicar la particularidades observadas en la modulación de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  de las células cromafines de la rata.

#### **5.4. Importancia fisiológica del nAChR $\alpha_9\alpha_{10}$ en la exocitosis de las células cromafines de la rata**

Las células cromafines de la médula adrenal participan mediante la secreción de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) al torrente circulatorio en las respuestas de lucha o huida orquestadas por el sistema nervioso autónomo en situaciones de estrés. Como ya ha sido mencionado, la secreción de catecolaminas obedece a un mecanismo exocitótico activado por el incremento de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . En condiciones fisiológicas, los nAChRs de las células cromafines desempeñan un papel fundamental en el acoplamiento excitación-secreción de catecolaminas al mediar los efectos de la ACh liberada por las terminaciones de las fibras simpáticas preganglionares del nervio esplácnico. Clásicamente se ha considerado que los nAChRs intervienen en la

señalización celular del  $\text{Ca}^{2+}$  –y por extensión, en la respuesta secretora– de forma indirecta, mediante la generación de un potencial excitador que, a su vez, desencadena potenciales de acción dependientes tanto de la entrada de  $\text{Na}^+$  como de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje. La subsiguiente elevación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pondría en marcha la respuesta secretora<sup>(168,169)</sup>. No obstante, diversas observaciones, incluyendo algunas realizadas en los años 60 del pasado siglo, como las que evidencian la capacidad de la ACh para inducir una repuesta secretora en ausencia de  $\text{Na}^+$  extracelular<sup>(168)</sup>, o en células despolarizadas con soluciones de alto  $\text{K}^+$  que inactivan los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje<sup>(170)</sup>, o incubadas con bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje<sup>(171)</sup>, llevaron a sugerir que tal vez el  $\text{Ca}^{2+}$  podría penetrar a la través de los nAChRs para activar la exocitosis. El hallazgo, relativamente reciente, de nAChRs dotados de elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , como los  $\alpha_7$  y los  $\alpha_9\alpha_{10}$ , ha otorgado plausibilidad molecular a un acoplamiento directo entre los nAChRs y la señal celular del  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>(65,169)</sup>.

El estudio de un acoplamiento directo entre la activación de los nAChRs y la respuesta secretora debe realizarse en condiciones que eviten que la activación de los nAChRs se traduzca en una despolarización de la membrana celular. Este ha sido el caso de los experimentos realizados en este trabajo, que se han llevado a cabo en células individuales bajo fijación de voltaje. En estas circunstancias, a pesar de que la práctica totalidad de las células cromafines exhibieron una adecuada exocitosis –medida mediante el cambio de la capacitancia celular– en respuesta a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje, sólo una pequeña minoría presentó incrementos de la capacitancia celular al ser estimuladas con ACh (22%) u Oxo-M (14%) al potencial de -70 mV. Además, la magnitud de los incrementos registrados estaba próxima al límite de detección de nuestro equipo (10 fF). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Mollard y col. (1995)<sup>(172)</sup> en células cromafines bovinas, en las que la administración de pulsos de 200 ms de Nic da lugar a incrementos de capacitancia superiores a los 300 fF. Probablemente, el hecho de que la Nic sea capaz de inducir en las células cromafines bovinas corrientes con cargas 50-100 veces superiores a las activadas en las células cromafines de la rata y capaces de promover la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares explique las diferencias cuantitativas entre las respuestas secretoras observadas en las células de ambas especies<sup>(173)</sup>. Cuando se despolarizaron las células hasta -30 mV, un potencial que fácilmente alcanzan las células cromafines al ser estimuladas con ACh<sup>(174)</sup> y que coincide

con el umbral de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje<sup>(175)</sup>, se observó un marcado incremento en la eficiencia del acoplamiento entre la corriente  $-y$ , consiguientemente, entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs y la respuesta secretora. Ello es probablemente debido a un efecto sinérgico y acumulativo sobre la maquinaria secretora del  $\text{Ca}^{2+}$  que penetra en las células a través de los nAChRs y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Se debe subrayar que el incremento de eficiencia –estimada tanto mediante el porcentaje de células en las que se observó un aumento de capacitancia como por la relación entre la carga de la corriente nicotínica y la respuesta secretora– fue mayor al emplear la Oxo-M que la ACh, en consonancia con la mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ .

## **Capítulo VI: Conclusiones**

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y de la discusión de los mismos, podemos formular las siguientes conclusiones:

1. Las células cromafines de la rata transcriben ARNm codificante para la subunidades  $\alpha_9$  y  $\alpha_{10}$ , que se traducen en nAChRs funcionales cuya composición más probable es la de heterómeros constituidos por ambas subunidades.
2. Los nAChR  $\alpha_9\alpha_{10}$  forman canales iónicos no selectivos para cationes con la siguiente secuencia de permeabilidad para los iones monovalentes:  $\text{Cs}^+ > \text{Na}^+ \geq \text{Li}^+ \gg \text{Tris}^+$ . Así mismo, los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  presentan una  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de 8,9 lo que les sitúa entre los nAChRs con mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular produce un efecto dual sobre los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ : *inhibidor*, dependiente de voltaje y probablemente debido a la interacción del  $\text{Ca}^{2+}$  con la pared del poro iónico, y *potenciador*, no dependiente de voltaje y ejercido a nivel extracelular.
4. El  $\text{Ca}^{2+}$  que penetra a la célula cromafín a través de los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  puede contribuir de forma directa a la respuesta secretora de catecolaminas, siendo su participación más eficiente durante los periodos de actividad eléctrica celular.



## **Capítulo VII: Referencias bibliográficas**

1. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Gavin P. Vinson. Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocrine Rev.* 1998; 19(2): 101–43.
2. Flórez, J. Acciones de los Fármacos II. Mecanismos moleculares. En: *Farmacología humana*. Flórez, J, Armijo, JA y Mediavilla, A. (ed.). 2003; pp. 19-49. Masson. Barcelona. España.
3. Kawata M, Yuri K, Morimoto M. Steroid hormone effects on gene expression, neuronal structure, and differentiation. *Horm Behav.* 1994; 28(4):477-82.
4. Paradiso K, Sabey K, Evers AS, Zorumski CF, Covey DF, Steinbach JH. Steroid inhibition of rat neuronal nicotinic  $\alpha 4\beta 2$  receptors expressed in HEK 293 cells. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(2):341-51.
5. Curtis L, Buisson B, Bertrand S, Bertrand D. Potentiation of human  $\alpha 4\beta 2$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol Pharmacol.* 2002; 61:127–135.
6. Artalejo, AR. Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En: *The electrophysiology of neuroendocrine cells*. Herscheler, J y Scherubl, H. (ed.). 1995; pp. 259-99. CRC Press, Boca Raton, Florida.
7. Aunis D y Langley K. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand.* 1999; 167:89-97.
8. Carrasco GA y Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463(1-3):235-72.
9. Burgoyne RD. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1071(2):174-202.
10. Plattner H, Artalejo AR, Neher E. Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol.* 1997; 139(7):1709-17.
11. Douglas WW y Rubin RP. Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature.* 1961; 192:1087-9.
12. Chow RH, Von Ruden L, Neher E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal cromaffin cells. *Nature.* 1992; 356: 60-3.
13. Neher E y Marty A. Discrete changes in cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 6712-6.
14. Holman ME, Coleman HA, Tonta MA, Parkinson HC. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea pigs. *J Physiol.* 1994; 478: 115-24.

15. Kajiwarra R, Sand O, Kidokoro Y, Barish ME, Iijima T. Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jap J Physiol.* 1997; 47: 229-464.
16. Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C, Guérineau N. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci.* 2001; 21: 5397-405.
17. Douglas WW y Rubin RP. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol.* 1961; 159: 40.
18. Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol.* 1968; 34: 453-74.
19. Ceña V, Nicolas GP, Sanchez-Garcia P, Kirpekar SM, Garcia AG. Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience.* 1983; 10(4):1455-62.
20. Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Montero M, Alvarez J. Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol.* 1999; 144(2):241-54.
21. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Alvarez J. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(2):57-61.
22. Parsons TD, Coorsen JR, Horstmann H, Almers W. Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron.* 1995; 15(5):1085-96.
23. Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G, Lindau M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature.* 1997; 389(6650):509-12.
24. Fischer-Colbrie R, Diez-Guerra J, Emson PC, Winkler H. Bovine chromaffin granules: immunological studies with antisera against neuropeptide Y, [Met]enkephalin and bombesin. *Neuroscience.* 1986; 18(1):167-74.
25. Livett BG, Day R, Elde RP, Howe PR. Co-storage of enkephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. *Neuroscience.* 1982; 7(5):1323-32.
26. Shiotani Y, Kimura S, Ohshige Y, Yanaihara C, Yanaihara N. Immunohistochemical localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the adrenal medulla of the rat. *Peptides.* 1995; 16(6):1045-50.

27. Tabarin A, Chen D, Hakanson R, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the adrenal gland of mammals: distribution, characterization and responses to drugs. *Neuroendocrinology*. 1994; 59(2):113-9.
28. Lundberg JM, Rokaeus A, Hokfelt T, Rosell S, Brown M, Goldstein M. Neurotensin-like immunoreactivity in the preganglionic sympathetic nerves and in the adrenal medulla of the cat. *Acta Physiol Scand*. 1982; 114(1):153-5.
29. Peltto-Huikko M, Salminen T, Hervonen A. Localization of enkephalin- and neurotensin-like immunoreactivities in cat adrenal medulla. *Histochemistry*. 1987; 88(1):31-6.
30. Bjartell A, Persson P, Absood A, Sundler F, Hakanson R. Helodermin-like peptides in noradrenaline cells of adrenal medulla. *Regul Pept*. 1989; 26(1):27-34.
31. Weiss C, Cahill AL, Laslop A, Fischer-Colbrie R, Perlman RL, Winkler H. Differences in the composition of chromaffin granules in adrenaline and noradrenaline containing cells of bovine adrenal medulla. *Neurosci Lett*. 1996; 211(1):29-32.
32. Gandia L, Garcia AG, Morad M. ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol*. 1993; 470:55-72.
33. Winkler H, Fischer-Colbrie R. Regulation of the biosynthesis of large dense-core vesicles in chromaffin cells and neurons. *Cell Mol Neurobiol*. 1998; 18(2):193-209.
34. Fernández-Chacón R y Südhof TC. Genetics of synaptic vesicle function: Toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annu. Rev. Physiol*. 1999; 61: 753-776.
35. Janz R y Südhof TC. SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience*. 1999; 94: 1279-90.
36. Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 1999; 354: 269-79.
37. Südhof TC, Baumert M, Perin MS, Jahn R. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*. *Neuron*. 1989; 2: 1475-81.
38. Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*. 1992; 256: 1021-25.
39. Südhof TC. Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 7629-32.
40. Yoshihara M, Adolfsen B, Littleton JT. Is synaptotagmin the calcium sensor? *Curr. Opin. Neurobiol*. 2003; 13: 315-23.

41. Burgoyne RD y Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* 2003; 83(2):581-632.
42. Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Sheller RH, Rothman JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell.* 1993; 75: 409-18.
43. Whiteheart SW, Rossnagel K, Buhrow SA, Brunner M, Jaenicke R, Rothman JE. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* 1994; 126: 945-54.
44. Rothman JE. The machinery and principles of vesicle transport in the cell. *Nat. Med.* 2002; 8: 1059-62.
45. Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell.* 1997; 90: 523-35.
46. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1998; 395: 347-353.
47. Paterson D y Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology.* 2000; 61: 75-111.
48. Briley MS y Changeux JP. Isolation and purification of the nicotinic acetylcholine receptor and its functional reconstitution into a membrane environment. *Int Rev Neurobiol.* 1977; 20:31-63.
49. Sobel A, Weber M, Changeux JP. Large-scale purification of the acetylcholine-receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from *Torpedo marmorata* electric organ. *Eur J Biochem.* 1977; 80(1):215-24.
50. Sumikawa K, Houghton M, Smith JC, Bell L, Richards BM, Barnard EA. The molecular cloning and characterisation of cDNA coding for the alpha subunit of the acetylcholine receptor. *Nucleic Acids Res.* 1982; 10(19): 5809–22.
51. Strader CD y Raftery MA. Topographic studies of *Torpedo* acetylcholine receptor subunits as a transmembrane complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77(10): 5807–11.
52. Adams DJ, Dwyer TM, Hille B. The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *J Gen Physiol.* 1980; 75(5):493-510.
53. Dwyer TM, Adams DJ, Hille B. The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J Gen Physiol.* 1980; 75(5):469-92.
54. Unwin N. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Letters.* 2003; 555: 91-5.

55. Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* 2005; 346(4):967-89.
56. Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J. Assembly of human neuronal nicotinic receptor  $\alpha 5$  subunits with  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 4$  subunits. *J Biol Chem.* 1996; 271(30): 17656-65.
57. Fucile S.  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 2004; 35: 1–8
58. Fucile S, Sucapane A, Eusebi F.  $\text{Ca}^{2+}$  permeability through rat cloned alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 2006; 39(4):349-55.
59. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Principios generales. Cómo actúan los fármacos. En: *Farmacología.* Elsevier (ed.). 2004; p. 2-113. Madrid. España.
60. Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux JP. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21(6):211-7.
61. Karadsheh MS, Shah MS, Tang X, Macdonald RL, Stitzel JA. Functional characterization of mouse alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in HEK293T cells. *J Neurochem.* 2004; 91(5):1138-50.
62. Luo S, Kulak JM, Cartier GE, Jacobsen RB, Yoshikami D, Olivera BM, McIntosh JM. alpha-conotoxin AulB selectively blocks alpha3 beta4 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J Neurosci.* 1998; 18(21):8571-9.
63. Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Olivera BM, McIntosh JM. A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 1996; 271(13):7522-8.
64. Di Angelantonio S, Matteoni C, Fabbretti E, Nistri A. Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci.* 2003; 17(11):2313-22.
65. López MG, Montiel C, Herrero CJ, García-Palomero E, Mayorgas I, Hernández-Guijo JM, Villarroya M, Olivares R, Gandía L, McIntosh JM, Olivera BM, García AG. Unmasking the functions of the chromaffin cell alpha7 nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(24):14184-9.
66. Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci.* 1997; 9(12):2734-42.

67. Papke RL, Meyer E, Nutter T, Uteshev VV. Alpha7 receptor-selective agonists and modes of alpha7 receptor activation. *Eur J Pharmacol.* 2000; 393(1-3):179-95.
68. Alkondon M, Albuquerque EX. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 265(3):1455-73.
69. Ellison M, Gao F, Wang HL, Sine SM, McIntosh JM, Olivera BM. Alpha-conotoxins ImI and ImII target distinct regions of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes. *Biochemistry.* 2004; 43(51):16019-26.
70. Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernández MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron.* 1990; 5(6):847-56.
71. Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann S, Boulter J.  $\alpha 10$ : A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 3501-6.
72. Mousavi M, Hellstrom-Lindahl E, Guan ZZ, Bednar I, Nordberg A. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci.* 2001; 70: 577-90.
73. Criado M, Dominguez del Toro E, Carrasco-Serrano C, Smillie FI, Juiz JM, Viniegra S, Ballesta JJ. Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J Neurosci.* 1997; 17(17):6554-64.
74. Gu H, Wenger BW, Lopez I, McKay SB, Boyd RT, McKay DB. Characterization and localization of adrenal nicotinic acetylcholine receptors: evidence that mAb35-nicotinic receptors are the principal receptors mediating adrenal catecholamine secretion. *J Neurochem.* 1996; 66(4):1454-61.
75. Campos-Caro A, Smillie FI, Domínguez del Toro E, Rovira JC, Vicente-Agullo F, Chapuli J, et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem.* 1997; 68: 488-97.
76. Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S.  $\alpha 9$ : an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Neuron.* 1994; 79: 705-15.
77. Hiel H, Luebke AE, Fuchs PA. Cloning and expression of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in cochlear hair cells of the chick. *Brain Res.* 2000; 858(1):215-25.

78. Luebke AE, Maroni PD, Guth SM, Lysakowski A. Alpha-9 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in the rodent vestibular labyrinth. *J Comp Neurol.* 2005; 492(3):323-33.
79. Keiger CJ, Walker JC. Individual variation in the expression profiles of nicotinic receptors in the olfactory bulb and trigeminal ganglion and identification of alpha2, alpha6, alpha9, and beta3 transcripts. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59(3):233-40.
80. Liu L, Chang GQ, Jiao YQ, Simon SA. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Brain Res.* 1998; 809(2):238-45.
81. Lips KS, Pfeil U, y Kummer W. Coexpression of alpha9 and alpha10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 2002; 115: 1-5.
82. Dvorakova M, Lips KS, Bruggmann D, Slavikova J, Kuncova J, Kummer W. Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the rat heart. *Cell Tissue Res.* 2005; 319(2):201-9. Epub 2004 Nov 10.
83. Lustig LR, Peng H, Hiel H, Yamamoto T, Fuchs PA. Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics.* 2001; 73(3):272-83.
84. Peng H, Ferris RL, Matthews T, Hiel H, Lopez-Albaitero A, Lustig LR. Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci.* 2004; 76(3):263-80.
85. Nguyen VT, Ndoeye A, Grando SA. Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol.* 2000; 157(4):1377-91.
86. Liu RH, Mizuta M, Matsukura S. The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310(1):52-8.
87. Kumar P, Meizel S. Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *J Biol Chem.* 2005; 280(27):25928-35.
88. Bruggmann D, Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W. Rat arteries contain multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits. *Life Sci.* 2003; 72(18-19):2095-9.
89. Bruggmann D, Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W. Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial system of the rat. *Histochem Cell Biol.* 2002; 118(6):441-7.
90. Zuo J, Treadaway J, Buckner TW, Fritsch B. Visualization of alpha9 acetylcholine receptor expression in hair cells of transgenic mice containing a modified bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(24):14100-5.



91. Sgard F, Charpentier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, et al. A novel human nicotinic receptor subunit,  $\alpha 10$ , that confers functionality to the  $\alpha 9$ -subunit. *Mol Pharmacol*. 2002; 61:150-9.
92. Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB. Stoichiometry of the  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci*. 2005; 25(47):10905-12
93. Katz E, Verbitsky M, Rothlin CV, Vetter DE, Heinemann SF, Elgoyhen AB. High calcium permeability and calcium block of the  $\alpha 9$  nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Res*. 2000; 141(1-2):117-28.
94. Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E. The  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hearing Res*. 2002; 167: 122-35.
95. Gomez-Casati ME, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Katz E. Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *J Physiol*. 2005; 566(Pt 1):103-18.
96. McNiven AI, Yuhas WA, Fuchs PA. Ionic dependence and agonist preference of an acetylcholine receptor in hair cells. *Auditory Neuroscience*. 1996; 2 (1): 63-77.
97. Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffioti-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB. Role of  $\alpha 9$  nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron*. 1999; 23(1):93-103.
98. Blanchet C, Erostequi C, Sugawara M, Dulon D. Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J Neurosci*. 1996; 16(8):2574-84.
99. Oliver D, Klocker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppersberg JP, Fakler B. Gating of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron*. 2000; 26(3):595-601.
100. Sridhar TS, Brown MC, Sewell WF. Unique postsynaptic signaling at the hair cell efferent synapse permits calcium to evoke changes on two time scales. *J Neurosci*. 1997; 17(1):428-37.
101. Hamill OP y Sakmann B. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature*. 1981; 294(5840):462-4.
102. Akaike N, Harata N. Nystatin perforated patch recording and its applications to analyses of intracellular mechanisms. *Jpn J Physiol*. 1994; 44(5):433-73
103. Horn R, Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*. 1988; 92(2):145-59.

104. Sala S, Parsey RV, Cohen AS, Matteson DR. Analysis and use of the perforated patch technique for recording ionic currents in pancreatic beta-cells. *J Membr Biol.* 1991; 122(2):177-87.
105. Hirano T, Kidokoro Y, Ohmori H. Acetylcholine dose-response relation and the effect of cesium ions in the rat adrenal chromaffin cell under voltage clamp. *Pflugers Arch.* 1987; 408(4):401-7.
106. Nooney JM, Peters JA, Lambert JJ. A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *J Physiol.* 1992; 455:503-27.
107. Gillis KD, Pun RY, Misler S. Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch.* 1991; 418(6):611-3.
108. Horrigan FT y Bookman RJ. Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron.* 1994; 13(5):1119-29.
109. Lewis CA. Ion-concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance of ion channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol.* 1979; 286:417-45.
110. Robinson, RA, Stokes RH. *Electrolyte Solutions*, 2nd ed.; Butterworths. London 1959.
111. Neher E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol.* 1992; 207:123-31.
112. Barry PH y Lynch JW. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol.* 1991; 121(2):101-17.
113. Ng B y Barry PH. The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology. *J Neurosci Methods.* 1995; 56(1):37-41.
114. Baldelli P, Hernandez-Guijo JM, Carabelli V, Novara M, Cesetti T, Andres-Mateos E, Montiel C, Carbone E. Direct and remote modulation of L-channels in chromaffin cells: distinct actions on  $\alpha 1C$  and  $\alpha 1D$  subunits?. *Mol Neurobiol.* 2004; 29(1):73-96.
115. Andres-Mateos E, Renart J, Cruces J, Solis-Garrido LM, Serantes R, de Lucas-Cerrillo AM, Aldea M, Garcia AG, Montiel C. Dynamic association of the  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 1A$  subunit and SNAP-25 in round or neurite-emitting chromaffin cells. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(9):2187-98.
116. Khiroug L, Sokolova E, Giniatullin R, Afzalov R, Nistri A. Recovery from desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells is modulated by intracellular calcium through distinct second messengers. *J Neurosci.* 1998; 8(7):2458-66.

117. Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* 2005; 28(7):371-8.
118. Pereira EF, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 2002; 53(4):479-500.
119. Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.* 1993; 13(2):596-604.
120. Ruano D, Lambolez B, Rossier J, Paternain AV, Lerma J. Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron.* 1995; 14:1009-17.
121. Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron.* 1992; 9: 247-58.
122. Carabelli V, Gianniccoli A, Baldelli P, Carbone E, Artalejo AR. Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys. J.* 2003; 85:1326-1337.
123. Park YB, Herrington J, Babcock DF, Hille B. Ca<sup>2+</sup> clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol.* 1996; 492 ( Pt 2):329-46.
124. Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol.* 1976; 263(3):417-39.
125. Kilpatrick DL, Slepetis R, Kirshner N. Ion channels and membrane potential in stimulus-secretion coupling in adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* 1981; 36:1245-55.
126. Fenwick EM, Marty A, Neher E. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol.* 1982; 331:577-97.
127. Rettig J, Neher E. Emerging roles of presynaptic proteins in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Science.* 2002; 298: 781-5.
128. Artalejo AR. La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. *Anal. Real Acad. Farm.* 2005; 71: 127-151.
129. Abad-Santos F. In vitro models for the study of nerve lesions and potential neuroprotective drugs. *Rev Neurol.* 1997; 25: 2015-21.
130. Rothlin CV, Katz E, Verbitsky, M, Elgoyhen AB. The  $\alpha 9$  nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A  $\gamma$ -aminobutyric acid, glycine, and Type 3 serotonin receptors. *Mol Pharmacol.* 1999; 55(2):248-54.

131. Baker ER Zwart R Sher E and Millar NS. Pharmacological properties of alpha9 alpha10 nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol. Pharmacol.* 2004; 65: 453-460.
132. Lawoko G, Jarlebark L, Heilbronn E. Ligand-binding properties of an unusual nicotinic acetylcholine receptor subtype on isolated outer hair cells from guinea pig cochlea. *Neurosci Lett.* 1995; 195(1):64-8.
133. Rothlin CV, Lioudyno MI, Silbering AF, Plazas PV, Casati ME, Katz E, Guth PS, Elgoyhen AB. Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol.* 2003; 63(5):1067-74.
134. Verbitsky M, Rothlin CV, Katz E, Elgoyhen AB. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology.* 2000; 39(13):2515-24.
135. Sine SM y Steinbach JH. Agonists block currents through acetylcholine receptor channels *Biophys J.* 1984; 46(2):277-83.
136. Uteshev VV, Meyer EM, Papke RL. Activation and inhibition of native neuronal alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic ACh receptors. *Brain Res.* 2002; 948(1-2):33-46.
137. Papke RL y Papke, JK. Comparative pharmacology of rat and human  $\alpha 7$  nAChR conducted with net charge analysis. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 137: 49-61.
138. Papke RL, Bencherif M, Lippiello P. An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett.* 1996; 213(3):201-4.
139. Yokotani K, Okada S, Nakamura K. Characterization of functional nicotinic acetylcholine receptors involved in catecholamine release from the isolated rat adrenal gland. *Eur J Pharmacol.* 2002; 446(1-3):83-7.
140. Martín AO, Mathieu MN, Guérineau NC. Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 2003; 23: 3669-3678.
141. Chen D y Patrick JW. The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem.* 1997; 272: 24024-9.
142. Colquhoun LM y Patrick JW. Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol.* 1997; 39: 191-220.
143. Stokes C, Papke JK, Horenstein NA, Kem WR, McCormack TJ, Papke RL. The structural basis for GTS-21 selectivity between human and rat nicotinic alpha7 receptors. *Mol Pharmacol.* 2004; 66(1):14-24.

144. Ward JM, Cockcroft VB, Lunt GG, Smillie FS, Wonnacott S. Methylllycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett.* 1990; 270(1-2):45-8.
145. Cohen BN, Labarca C, Davidson N, Lester HA. Mutations in M2 alter the selectivity of the mouse nicotinic acetylcholine receptor for organic and alkali metal cations. *J Gen Physiol.* 1992; 100(3):373-400.
146. Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand S, Changeux JP. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(15):6971-5.
147. Haghighi AP y Cooper E. A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine alpha3beta4 and alpha4beta2 receptors. *J Neurosci.* 2000; 20(2):529-41.
148. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3(2):102-14.
149. Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem.* 2005; 48(15):4705-45.
150. Nutter TJ y Adams DJ. Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia. *J Gen Physiol.* 1995; 105(6):701-23.
151. Fucile S, Sucapane A, Eusebi F. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors from rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 2005; 565(Pt 1):219-28.
152. Mathie A, Colquhoun D, Cull-Candy SG. Rectification of currents activated by nicotinic acetylcholine receptors in rat sympathetic ganglion neurones. *J Physiol.* 1990; 427:625-55.
153. Sands SB y Barish ME. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor currents in phaeochromocytoma (PC12) cells: dual mechanisms of rectification. *J Physiol.* 1992; 447:467-87.
154. Ifune CK y Steinbach JH. Inward rectification of acetylcholine-elicited currents in rat phaeochromocytoma cells. *J Physiol.* 1992; 457:143-65.
155. Wilson GG y Karlin A. The location of the gate in the acetylcholine receptor channel. *Neuron.* 1998; 20(6):1269-81.
156. Haghighi AP, y Cooper E. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are blocked by intracellular spermine in a voltage-dependent manner. *J Neurosci.* 1998; 18(11):4050-62.

157. Adams DJ, Nutter TJ. Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J Physiol Paris*. 1992; 86(1-3):67-76.
158. Vernino S, Rogers M, Radcliffe KA, Dani JA. Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*. 1994; 14(9):5514-24.
159. Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron*. 1992; 8(1):127-34.
160. Zhou Z y Neher E. Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 1993; 425(5-6):511-7.
161. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3ª Ed. 2001. Sinauer, Sunderland, Mass.
162. Woodhull AM. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol*. 1973; 61(6):687-708.
163. Decker ER, Dani JA. Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant. *J Neurosci*. 1990; 10(10):3413-20.
164. Mulle C, Lena C, Changeux JP. Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron*. 1992; 8(5):937-45.
165. Amador M y Dani JA. Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci*. 1995; 15(6):4525-32.
166. Liu QS y Berg DK. Extracellular calcium regulates responses of both alpha3- and alpha7-containing nicotinic receptors on chick ciliary ganglion neurons. *J Neurophysiol*. 1999; 82(3):1124-32.
167. Booker TK, Smith KW, Dodrill C, Collins AC. Calcium modulation of activation and desensitization of nicotinic receptors from mouse brain. *J Neurochem*. 1998; 71(4):1490-500.
168. Douglas WW, Rubin RP. The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol*. 1963; 167: 288-310.
169. Dajas-Bailador F y Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. : *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25(6):317-24.
170. Ishikawa K y Kanno T. Influence of extracellular calcium and potassium concentrations on adrenaline release and membrane potencial in the perfused adrenal medulla of the rat. *Jpn. J. Physiol*. 1978; 28: 275-89.

171. Montiel C, Artalejo AR, Sanchez-Garcia P, Garcia AG. Two components in the adrenal nicotinic secretory response revealed by cobalt ramps. *Eur J Pharmacol.* 1993; 230: 77-84.
172. Mollard P, Seward EP, Nowycky MC. Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 3065-69.
173. Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98: 4148-53.
174. Zhou Z y Misler S. Action potencial-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 3498-595.
175. Hollins B e Ikeda SR. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol.* 1996; 76:1195-211.